

# **Universidad Autónoma de Madrid**

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina



**RELEVANCIA DE LAS ANGIOPOYETINAS COMO BIOMARCADORES DE PROGRESIÓN DE LA HEPATITIS CRÓNICA C: *Desarrollo de AngioScore como nuevo índice no invasivo de fibrosis hepática.***

**Memoria que presenta Ángel Hernández Bartolomé para optar al  
Grado de Doctor:**

**Directores:**

**Prof. Ricardo Moreno Otero**

**Dra. Paloma Sanz Cameno**

**Madrid, 2014**

*A mis padres Clotilde y Ángel.*

*A Liliana.*

## AGRADECIMIENTOS

*Me gustaría aprovechar estas líneas para agradecer a todas las personas que de una o de otra forma me han ayudado para la finalización de este trabajo.*

*En primer lugar quisiera darle las gracias al **Dr. Ricardo Moreno Otero**, Jefe del Servicio de Digestivo y director de mi tesis doctoral por darme la oportunidad de formar parte de un excelente equipo de investigación durante el transcurso de mi Tesis, le agradezco sinceramente su confianza, ayuda, consejos y todo el apoyo que me ha brindado en los buenos y malos momentos.*

*Mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis, **Dra. Paloma Sanz Cameno**, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y motivación ha contribuido a mi crecimiento profesional y a la consecución de esta Tesis.*

*A **Rosario** y a **Yoli**, por estar siempre dispuestas a colaborar y compartir el día a día en el laboratorio.*

*A **Samuel**, por enseñarme todos los secretos del agua destilada.*

*A **María Jesús**, por su colaboración y apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto.*

*A cada una de las personas que forman parte de los grupos de la 9ª y los componentes del Servicio de Digestivo del Hospital con los que he compartido experiencias, anécdotas y risas. Gracias por el buen ambiente de trabajo y porque siempre que lo he necesitado me habéis prestado vuestra ayuda.*

*Tampoco me puedo olvidar de los pacientes que donaron sus muestras voluntariamente para la investigación.*

*También gracias al **Dr. Giuseppe Castello** y la **Dra. Costantini** por aceptarme en su equipo de investigación y ofrecerme su ayuda durante mi estancia en Italia.*

*Por último quiero expresar mi agradecimiento **a mi familia**. A mis padres por darme la vida y su apoyo constante. A mis **hermanas y cuñados** que se han molestado por conocer y entender mi trabajo. A mis **sobrinos**, por hacerme sonreír en los días grises. También a las personas que ya no están pero siguen presentes en mi corazón. A **Liliana**, por ser mi inspiración.*

---

# ÍNDICE

*“Aquel que no espera vencer ya está vencido.”*

*Benito Juárez (1806-1872).*

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>8</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>1. VIRUS DE LA HEPATITIS C .....</b>	<b>12</b>
1.1 Estructura y ciclo vital del VHC .....	12
1.2 Historia natural de la infección por el VHC .....	16
<b>2. HEPATITIS CRÓNICA C: MECANISMOS PATOGENICOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 Inflamación hepática .....	19
2.1.1 Respuesta inmune innata y adaptativa .....	20
2.1.2 Persistencia de la infección del virus de la hepatitis C .....	22
2.2 Fibrosis hepática .....	23
2.3 Angiogénesis .....	26
2.3.1 Mecanismos de angiogénesis .....	28
2.3.2 Sistema angiopoyetinas/Tie2 .....	32
2.4 Influencia de las proteínas virales en la progresión de la HCC .....	33
2.5 Marcadores angiogénicos .....	36
<b>3. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE FIBROSIS HEPÁTICA.....</b>	<b>38</b>
3.1 Biopsia hepática .....	39
3.2 Métodos no invasivos para la evaluación de fibrosis hepática .....	40
3.2.1 Marcadores directos .....	42
3.2.2 Marcadores indirectos .....	43
3.2.3 Elastografía de transición.....	45
<b>II. HIPÓTESIS .....</b>	<b>48</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>50</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
<b>1. PACIENTES Y SUJETOS CONTROL .....</b>	<b>52</b>
1.1 Muestras de tejido hepático de pacientes con HCC y sujetos control .....	53
1.2 Muestras séricas de pacientes con HCC .....	54
<b>2. LINEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO .....</b>	<b>54</b>
<b>3. WESTERN BLOTTING .....</b>	<b>56</b>
<b>4. ELISA .....</b>	<b>57</b>
<b>5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>58</b>
5.1 Diferencias de la expresión intrahepática de angiopoyetinas en pacientes con HCC y sujetos control.....	59
5.2 Análisis de variables relacionadas con la progresión de la HCC .....	59

5.3	Estudio de la expresión de Ang2 en distintos replicones del VHC .....	63
V.	RESULTADOS.....	67
1.	EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES TISULARES DE ANGIOPOYETINAS EN BIOPSIAS HEPÁTICAS.....	67
2.	ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ANGIOPOYETINAS EN EL SUERO DE PACIENTES CON HCC .....	74
2.1	Grupo de Estudio .....	74
2.1.1	Evaluación de las concentraciones séricas de angiopoyetinas .....	76
2.1.2	Valor diagnóstico de las angiopoyetinas .....	82
2.1.3	Análisis de la asociación de otras variables clínicas y demográficas con la FH ...	85
2.1.4	Desarrollo del nuevo índice no invasivo de FH .....	85
2.2	Grupo de Validación.....	89
2.2.1	Evaluación de las concentraciones séricas de angiopoyetinas .....	91
2.2.2	Valor diagnóstico de las angiopoyetinas .....	97
2.2.3	Validación de AS como nuevo índice no invasivo de FH .....	99
2.3	Poblacion total de pacientes con HCC.....	102
2.3.1	Evaluación de las concentraciones séricas de angiopoyetinas .....	102
2.3.2	Comparación de AS con otros índices de FH .....	105
3.	EXPRESIÓN DE ANG2 EN REPLICONES DEL VHC .....	115
3.1	Implicación de las vías de señalización PI3K y MAPK en la expresión de Ang2 .....	118
VI.	DISCUSIÓN.....	121
VII.	CONCLUSIONES.....	134
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
IX.	ANEXOS .....	158
	ANEXO I. ESQUEMA DE LOS REPLICONES DEL VHC.....	158
	ANEXO II. COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES ÍNDICES DIAGNÓSTICOS DE FH EN EL TOTAL DE PACIENTES HCC. ....	159
	ANEXO III. PUBLICACIÓN RELACIONADA.....	168

## ABREVIATURAS

AAR	Cociente aspartato aminotransferasa /alanina aminotransferasa
AH	Ácido hialurónico
ALT	Transaminasa glutámico pirúvico
Ang1	Angiopoyetina 1
Ang2	Angiopoyetina 2
APRI	Índice del cociente aspartato aminotransferasa / plaquetas
ARN	Ácido ribonucleico
AS	AngioScore
AST	Transaminasa glutámico oxalacético
AUC-ROC	Área bajo la curva ROC
BH	Biopsia hepática
CH	Cirrosis hepática
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CPA	Célula presentadora de antígeno
CPB	Cirrosis biliar primaria
CEs	Células endoteliales
CEH	Células estrelladas hepáticas
CD	Células dendríticas
CHC	Carcinoma hepatocelular
ROC	Curvas de rendimiento diagnóstico
EHC	Enfermedad hepática crónica
E	Especificidad



FA	Fosfatasa alcalina
FH	Fibrosis hepática
FBS	Suero bovino fetal
FCI	Índice de fibrosis-cirrosis
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FI	Índice de fibrosis
FS	FibroScan
FT	FibroTest
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GGT	Gamma-glutamyl transpeptidasa
GUCI	Índice de Cirrosis Universidad de Göteborg
HCC	Hepatitis crónica C
HIF	Factor inducible por hipoxia
HRP	Peroxidasa de rábano
IC	Intervalo de confianza
IFN	Interferón
IL	Interleucina
INR	Razón normalizada internacional
ME	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteasas de matriz extracelular
NASH	Hepatopatía no alcohólica
NK	Células “Natural Killer”
NCR	Regiones no codificantes
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE-2	Prostaglandina-2

PPD	Precisión prueba diagnóstica
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPN	Razón de probabilidad negativa
RPP	Razón de probabilidad positiva
ROC	Receiver-operating characteristic curve
S	Sensibilidad
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TBS	Tris Buffer Salino
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TIMPs	Inhibidores específicos de metaloproteasas de matriz extracelular
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TLR	Receptor "Toll-like"
UTR	Región no traducida
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la Hepatitis C
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VCAM1	Molécula de citoadhesión vascular 1

---

---

# INTRODUCCIÓN

*“Todos somos muy ignorantes:  
Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas.”  
Albert Einstein (1879-1955).*

## **I. INTRODUCCIÓN**

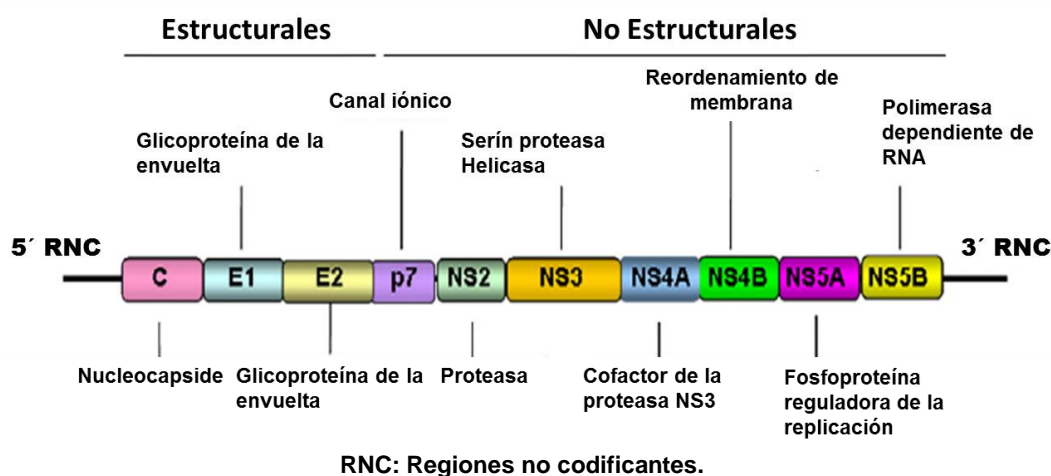
### **1. VIRUS DE LA HEPATITIS C**

La identificación y caracterización del virus de la hepatitis (VHC) se realizó en el año 1989 después de múltiples investigaciones para la detección del genoma del virus de la hepatitis no A y no B<sup>1</sup>. El VHC es un pequeño virus encapsulado, con una sola hebra de ARN de polaridad positiva, que pertenece al género Hepacivirus dentro de la familia Flaviviridae<sup>2</sup>.

#### **1.1 Estructura y ciclo vital del VHC**

La partícula viral se compone de una nucleocápside rodeada de una membrana lipídica. Dentro de la nucleocápside se encuentra el genoma viral formado por dos regiones no traducibles en los extremos 5' y 3' (5'-UTR y 3'-UTR) y una región de 9024 a 9111 nucleótidos que codifica a una única poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos<sup>3,4</sup>. Esta poliproteína, una vez traducida, se escinde por la acción de proteasas del huésped y también del virus en 10 proteínas. Las proteínas Core, E1 y E2 son proteínas estructurales: Core juega un importante papel en la morfogénesis de la partícula viral al ser la encargada de formar la nucleocápside que protege al genoma viral; por otra parte, las proteínas E1 y E2 son glicoproteínas que forman la envoltura, capaces de interaccionar con los receptores de superficie celular para facilitar la entrada del virus al interior celular. El resto de proteínas, denominadas no estructurales

(NS), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, están implicadas en la replicación del genoma viral y en el correcto procesamiento de la poliproteína que resulta de su transcripción. Entre las proteínas NS, NS5B tiene un papel primordial en la replicación viral ya que se corresponde con la ARN polimerasa dependiente de ARN; la ausencia de la capacidad correctora de errores en el proceso de replicación viral, añadido a la alta capacidad replicativa del VHC, favorece la acumulación de mutaciones que contribuyen a la variabilidad genética del virus (6 genotipos y 100 subtipos). Aunque la función de la última proteína descrita, p7, no está completamente esclarecida, se piensa que es importante en el establecimiento de la infección como canal iónico<sup>5,6</sup> (**Figura 1**).

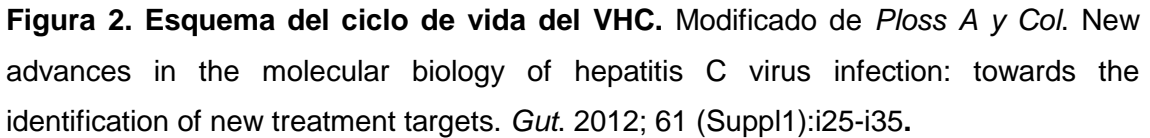


**Figura 1. Esquema del genoma del Virus de la hepatitis C.**

La ausencia de un sistema eficaz para el cultivo *in vitro* del VHC, capaz de generar cantidades significativas de viriones completos, ha dificultado bastante el conocimiento de los procesos de ensamblaje, maduración y liberación de las partículas víricas; no obstante, para hacer posible el estudio de la biología de este virus se han utilizado diversas aproximaciones experimentales como las

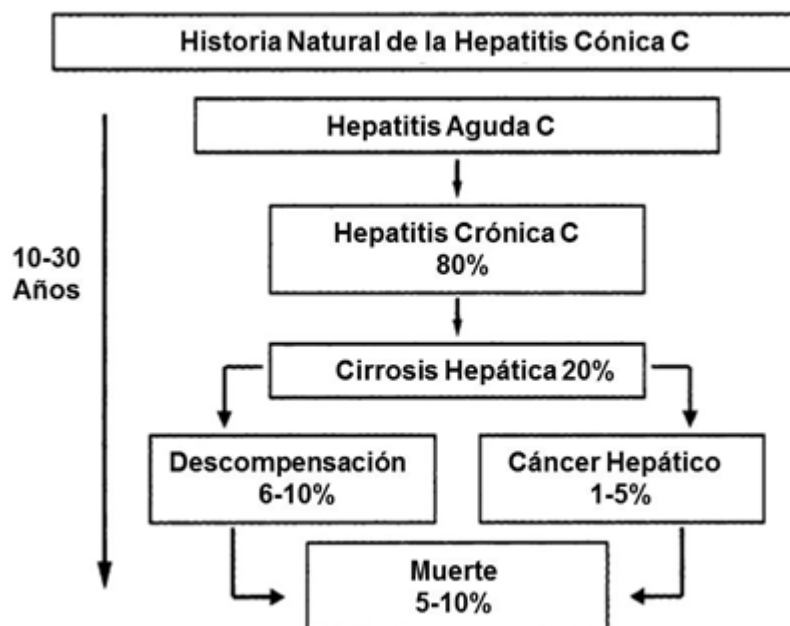
denominadas pseudopartículas (virus quiméricos constituidos por partículas de otros virus y proteínas de envuelta del VHC funcionales) que han permitido el estudio de los mecanismos de entrada bajo condiciones reproducibles. Otra alternativa para el estudio de la infección por el VHC se ha basado en el desarrollo de replicones del VHC, transfectantes estables del genoma completo o parcial del VHC capaces de replicarse en líneas celulares de hepatoma humano (Huh7) pero sin ser infectivos<sup>4,7,8</sup>. Por otra parte, el aislamiento de una cepa de genotipo 2a a partir de un paciente japonés con hepatitis fulminante (denominada JFH-1) permite la replicación completa del VHC en líneas celulares<sup>9</sup>, lo que ha constituido una herramienta muy valiosa para el estudio del ciclo vital del VHC. Esta cepa produce virus infectivo al replicarse en células Huh-7 y otras líneas celulares sin el requerimiento de mutaciones adaptativas. A pesar de todas esas estrategias, el ciclo replicativo del VHC en la célula del huésped no está completamente esclarecido debido a su enorme complejidad. En una primera etapa, el virus circula en la sangre unido a lípidos y en el momento en que contacta con la superficie celular del hepatocito sus glicoproteínas de membrana (E1, E2) se fijan de forma secuencial a 4 receptores celulares (SR-BI, CD81, Claudina-1 y Ocludina) que le permite su internalización mediante endocitosis<sup>7</sup>. El pH ácido del endosoma provoca un cambio conformacional en las glicoproteínas del virus, lo que lleva a la fusión de la membrana viral con la membrana del endosoma, produciéndose la liberación de la partícula viral desnuda al citoplasma de la célula para iniciar su replicación y traducción. El resultado final de la traducción es la formación de una poliproteína que se procesa por proteasas virales y celulares para dar lugar

a las diferentes proteínas individuales; el procesamiento comienza en el extremo N-terminal con la acción de las enzimas celulares, que liberan primero las proteínas estructurales y la proteína P7, y a continuación las proteínas NS<sup>10,11</sup>. Después de la traducción y el corte de la poliproteína, las nuevas proteínas interaccionan entre ellas para formar un complejo replicativo llamado replisoma, el cual utiliza la cadena positiva de ARN como molde para sintetizar una cadena negativa de ARN, que a su vez sirve como molde para sintetizar más cadenas positivas que son traducidas a poliproteína, o bien se empaquetan<sup>12</sup>. Por último, el ensamblaje viral tiene lugar cerca de gotas lipídicas, en las que se va acumulando la proteína Core. Además, el ARN viral es transportado desde los sitios de replicación a las gotas lipídicas mediante la replicasa viral. La proteína NS5A podría liberarse del complejo replicativo a la superficie de las gotas lipídicas y se produciría una interacción Core-NS5A que llevaría al transporte del ARN a la proteína Core, desencadenando la formación de la nucleocápside<sup>13</sup>. Las etapas tardías del ciclo viral son poco conocidas; la progenie viral asociada a lipoproteínas de la célula huésped se libera al medio extracelular mediante exocitosis<sup>14,15</sup> (**Figura 2**).



La historia natural de la infección del VHC es variable y compleja debido a las interacciones entre huésped, virus y factores ambientales<sup>16</sup>. El VHC se transmite principalmente por vía parenteral y en la mayoría de los casos es asintomática<sup>17</sup>. El 70-80% de los pacientes con infección aguda no son capaces de aclarar la viremia. La tasa de morbi-mortalidad asociada a la hepatitis crónica C (HCC) es la más alta entre las patologías hepáticas debido a que es una enfermedad progresiva cuya complicación más importante es el desarrollo de fibrosis hepática (FH) y deterioro progresivo de la función del hígado. En general, la HCC puede evolucionar a estadios más graves de FH e incluso en un 20% de los pacientes progresar a cirrosis hepática (CH) y carcinoma hepatocelular (CHC)<sup>18,19</sup> **(Figura 3)**.





**Figura 3. Esquema de la Historia natural de la hepatitis crónica C.**

El curso evolutivo de la enfermedad es lento, con pacientes que desarrollan fibrosis de moderada a grave en el transcurso de 20 a 30 años; sin embargo, existe un grupo importante de pacientes que progresan a fibrosis grave y cirrosis en un tiempo inferior a 20 años<sup>20,21</sup>.

La CH es la consecuencia final de un daño sostenido en el hígado que perpetúa procesos inflamatorios, fibrogénicos y angiogénicos patológicos provocando serias complicaciones arquitecturales y funcionales con gran repercusión en la circulación sanguínea hepática (hipertensión portal). Una vez establecida la CH, la supervivencia del paciente a los 10 años es de alrededor de un 70%-80. Además, el riesgo de desarrollar un CHC se sitúa entre 1-4% de los pacientes con cirrosis<sup>22</sup>.

Existen varios factores que influyen de forma decisiva en la evolución clínica de la HCC y en consecuencia en el desarrollo de cirrosis y CHC. Entre los factores

virales, el genotipo del virus se asocia con la progresión de fibrosis; en particular, pacientes con genotipo 3 van a presentar una progresión más rápida de fibrosis<sup>23</sup>. La edad del paciente, el consumo de alcohol, el sexo masculino, la coinfección con otros virus hepatotropos y la existencia de alguna forma de inmunosupresión subyacente son factores que se asocian a una progresión más rápida de la enfermedad hacia la CH<sup>24-31</sup>.

## **2. HEPATITIS CRÓNICA C: MECANISMOS PATOGENICOS**

La HCC debe ser entendida como una enfermedad multifactorial y progresiva en la que el daño hepatocelular y la inflamación persistente provocan en la mayoría de pacientes el desarrollo de FH. En la progresión de la enfermedad es clave la constante presencia de infiltrados inflamatorios (linfocitos T CD8+ activados, principalmente) que induce una intensa inflamación periportal y lobulillar hepáticas, así como una ampliación del espacio porta, contribuyendo aún más al daño hepatocelular y a que la enfermedad evolucione a etapas más avanzadas<sup>32,33</sup>.

En este estado de inflamación permanente se genera un incremento de la permeabilidad vascular y se liberan multitud de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas<sup>34</sup>. La liberación de estos mediadores proinflamatorios va a favorecer el reclutamiento de otras células inmunitarias como monocitos, macrófagos, plaquetas y otros leucocitos. Asimismo, estas células son capaces de sintetizar citocinas proangiogénicas y factores de crecimiento<sup>35,36</sup>, como HIF-1 $\alpha$ , IL-8, IL-1, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-18 que estimulan la angiogénesis de manera

directa al actuar sobre las células endoteliales (CE) o indirectamente estimulando la expresión de otros factores que a su vez activan la angiogénesis y FH por medio de su acción tanto proangiogénica como profibrogénica, como sucede con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), óxido nítrico (NO) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)<sup>36</sup>.

## **2.1 Inflamación hepática**

La infección por el VHC y su posible evolución a HCC depende en gran medida del equilibrio entre la tasa de replicación viral y la eficacia de la respuesta inmunológica del huésped para eliminarlo<sup>37-40</sup>. La respuesta inmune del paciente se considera fundamental no sólo como un mecanismo de defensa antiviral sino también como parte esencial en el desarrollo de los mecanismos de inflamación hepática y necrosis que favorece la progresión de la HCC hacia la CH. Cuando el sistema inmune no logra aclarar el virus, la infección del VHC se cronifica y se desencadena una respuesta inflamatoria persistente que induce un daño hepático progresivo que tiene como principal consecuencia el desarrollo de FH<sup>39,41-43</sup>.

La primera línea de defensa frente al ARN viral es la producción de mediadores inflamatorios e interferón tipo I (IFN;  $\alpha/\beta$ ) por parte de los hepatocitos infectados, mediante la activación de receptores de superficie de la célula hepática, toll like (TLR) y receptores RNA helicasa (RIG)<sup>44</sup>. El IFN tipo I induce un estado antiviral que se extiende a las células vecinas no infectadas y

promueve la activación de las diferentes células implicadas en la inmunidad innata como células *Natural Killer* (NK), células de Kupffer (macrófagos residentes del hígado) y las células dendríticas (CD). Esta respuesta antiviral provoca la activación del factor nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$ B) permitiendo su translocación al núcleo y la activación transcripcional de genes diana entre los cuales se encuentran citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8), varias moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y otros genes implicados en la inflamación<sup>45,46</sup>. Por lo tanto la activación de NF- $\kappa$ B parece ser esencial en la activación de múltiples efectos ligados al proceso patogénico de la evolución de la HCC.

#### 2.1.1 Respuesta inmune innata y adaptativa

Las CD son las células inmunes más importantes frente al VHC<sup>47</sup>. Estas células son capaces de producir interferones tipo I (IFNs) y son necesarias para la activación de las células T naïve, y otros tipos celulares de la inmunidad innata (células NK, macrófagos)<sup>48,49</sup>. Los receptores TLR y RIG-I son los verdaderos sensores de la respuesta de la inmunidad innata a la infección del VHC. RIG-1 ha sido descrito como imprescindible para la secreción de IFN- $\alpha$  por parte de las CD después de la infección por VHC mientras que el TLR es crítico para la respuesta del IFN mediado por el RNA del VHC en las CD<sup>50,51</sup>.

Otro tipo de mediadores de la inmunidad innata son los monocitos y macrófagos<sup>52</sup>. Éstos tienen la capacidad de ser, al igual que las CD, células presentadoras de antígenos (CPA). Su función principal consiste en capturar, procesar y presentar los antígenos extraños a los linfocitos, estimulando de esa forma la respuesta inmune celular<sup>53</sup>. También, se caracterizan por favorecer y

amplificar los procesos inflamatorios al liberar especies reactivas de oxígeno (ROS) y citocinas proinflamatorias<sup>54</sup>.

Por último, las células NK se activan por células infectadas o directamente por partículas virales, son capaces de lisar a las células afectadas a través de un gran repertorio de moléculas, incluyendo perforinas y granzimas así como moléculas que activan caspasas. Las caspasas activadas a su vez estimulan otras enzimas implicadas en el proceso de la apoptosis del hepatocito infectado. Además, se ha demostrado que las células NK inhiben la replicación del VHC en los hepatocitos a través de IFN- $\gamma$ <sup>55</sup>. Un subgrupo importante de células NK denominadas NK invariantes (iNK) secretan una amplia gama de citocinas con capacidad inmunomoduladora de tipo Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) y Th2 (IL-4 e IL-10), que activan la respuesta inmune antiviral mediada por macrófagos, CD y linfocitos T (CD4+ y CD8+), generando así un nexo entre la inmunidad innata y adaptativa<sup>56</sup>.

Entre las múltiples respuestas que se pueden generar en la inmunidad adaptativa celular, la respuesta inmunitaria a través de linfocitos T CD4+ y CD8+ tiene un papel determinante en el resultado final de la infección por el VHC<sup>39,57,58</sup>.

La unión de TLR-péptido-complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) induce la activación, diferenciación y expansión de las células cooperadoras T CD4+, que promueven el desarrollo de una respuesta celular con las células CD8+ como efectores principales (respuesta Th1), o una respuesta humoral mediada por anticuerpos producidos por los linfocitos B (respuesta Th2). Por su parte, las células T CD8+ activadas inhiben la replicación de los virus mediante dos funciones efectoras<sup>58,59</sup>: la primera se conoce como respuesta citotóxica,

que induce muerte celular a través de perforinas o del ligando de la proteína Fas presente en la superficie del linfocito T; la segunda o respuesta no citotóxica, controla la replicación viral sin muerte celular por citocinas como IFN- $\gamma$ , IL- 2, TNF- $\alpha$ , o bien quimiocinas como MIP-1- $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein*)<sup>33,60,61</sup>.

### 2.1.2 Persistencia de la infección del virus de la hepatitis C

El control y aclaramiento del VHC se asocia a una respuesta inmune vigorosa y multiespecífica<sup>62</sup> que tiene como consecuencia una rápida respuesta regenerativa de los hepatocitos infectados que son reemplazados por nuevos hepatocitos, reparándose así el tejido dañado. Sin embargo, después de la infección aguda la mayoría de pacientes no aclararan el virus, lo cual se atribuye por un lado a la depleción y supresión funcional de las células de la inmunidad innata (CD, NK) y, por otro lado, a la respuesta inmunitaria débil o transitoria de células T CD8+ y principalmente de células T cooperadoras CD4+ lo que facilita la persistencia de la viremia<sup>63,64</sup>. Además, los linfocitos B contribuyen a la cronicidad de la infección al inducir la producción de anticuerpos anti-VHC que favorecen la aparición de cuasiespecies virales<sup>63</sup>. El desarrollo de cuasiespecies junto a la producción de mutaciones de epítomos presentados por las células presentadoras de antígenos (CPA) es otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune, así como, el agotamiento de los linfocitos T como consecuencia de la continua exposición a la alta carga viral y la activa supresión de los linfocitos T CD4+<sup>65,66</sup>. Por último, la infección por el VHC parece afectar también a la funcionalidad de las células T CD8+

mediante la interrupción de su maduración y la alteración de su función efectora<sup>67</sup> y también podría inhibir el desarrollo de una respuesta humoral efectiva mediada por células B<sup>68</sup>.

## **2.2 Fibrosis hepática**

La FH se presenta en el transcurso de patologías crónicas hepáticas, tales como HCC, hepatitis crónica B (HCB), hepatitis autoinmune, hepatopatía alcohólica y no alcohólica (NASH), que surgen de un daño hepático continuado que provoca la desorganización de procesos de reparación y remodelado tisular que como resultado final originan una excesiva acumulación de matriz extracelular (ME)<sup>69,70</sup>.

Cuando se produce un daño hepático, se activan los procesos de reparación que pueden actuar de dos maneras muy distintas, dependiendo del agente causal de la lesión (alcohol, VHC...) y del tiempo que persista en el organismo. Si el daño es limitado, el tejido se regenera y los hepatocitos dañados que han sufrido muerte por necrosis o apoptosis son sustituidos por nuevos hepatocitos para regresar a las condiciones fisiológicas de reposo. Además, se genera un depósito de ME que proporciona una valiosa sujeción para los nuevos hepatocitos y favorece el mantenimiento de la arquitectura hepática. En cambio, si la necrosis de los hepatocitos se mantiene en el tiempo, como sucede en la HCC, se desarrolla una estimulación persistente y descontrolada del proceso reparativo tisular cuya consecuencia final es el reemplazo del tejido hepático normal por tejido fibrótico (conectivo) mediante la producción excesiva y desorganizada de ME (colágeno fibrilar tipo I, fibronectina y

glucosaminoglicanos) que origina la denominada cicatriz tisular del parénquima hepático y la consiguiente pérdida paulatina de la función hepática<sup>33,69,71,72</sup>.

Si el daño hepático persiste, la FH puede progresar hacia CH e incluso a CHC, debido sobre todo al desequilibrio que se produce entre la síntesis y degradación de la ME, como consecuencia de la disminución en la producción de MMPs, la sobreexpresión de inhibidores de MMPs (TIMPs) y el aumento de citocinas profibrogénicas como TGF- $\beta$ <sup>73,74</sup>.

Una vez establecida la CH, la arquitectura hepática presenta serias alteraciones como son la aparición de tabiques fibrosos, nódulos parenquimatosos de regeneración y una distorsión vascular que genera la elevación de la presión portal provocando hemorragias por rotura de las varices esofágicas<sup>75-77</sup>.

En el transcurso de este fenómeno, la activación de las células estrelladas hepáticas (CEH) es, sin duda, el proceso más relevante para que tenga lugar la fibrogenesis ya que son las células responsables de la síntesis de colágeno en el hígado fibrótico<sup>69,71,78</sup>. Estas células se localizan en el espacio subendotelial, entre los hepatocitos y las células endoteliales de los sinusoides hepáticos (espacio de Disse). En el hígado normal, su principal función consiste en almacenar vitamina A y secretar cantidades mínimas de las proteínas que forman la ME (colágenos, laminina, fibronectina)<sup>78</sup> en función del microambiente tisular.

Sin embargo, las CEH sufren una activación celular y un cambio de fenotipo en respuesta a un daño hepático durante el transcurso de las hepatopatías crónicas que les lleva a transformarse en otras células totalmente distintas (miofibroblastos). Las CEH activadas adquieren características tan importantes

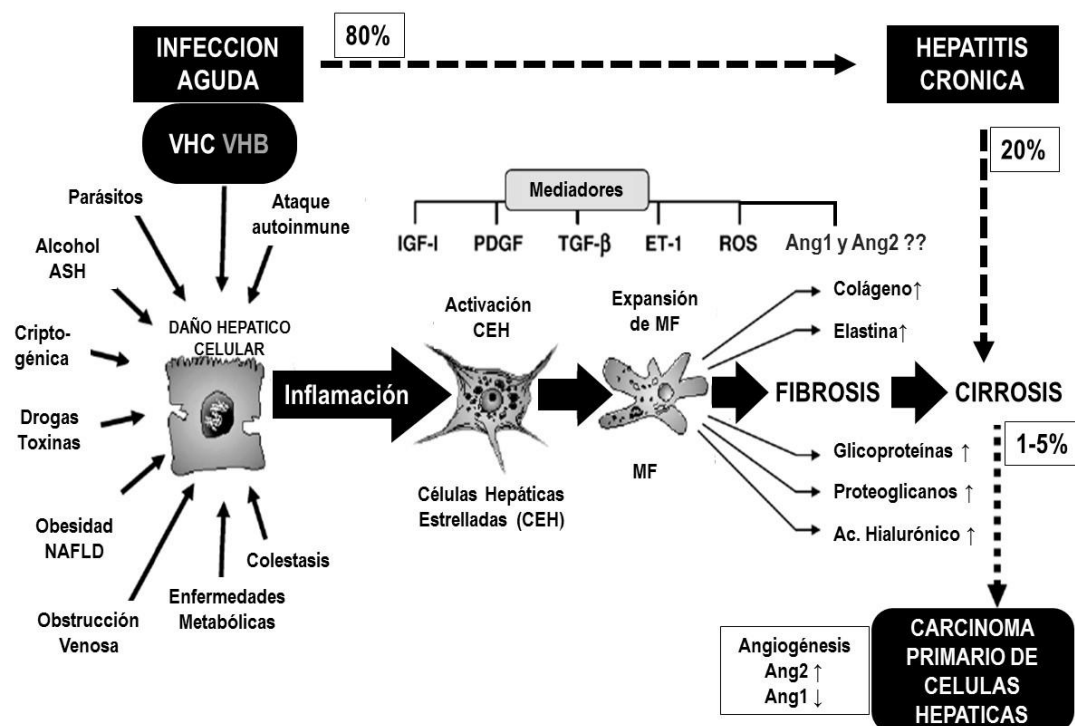


como la contractilidad celular y la capacidad de secretar citocinas proinflamatorias y ME (**Figura 4**).

La activación de las CEH puede clasificarse en 2 fases, iniciación y perpetuación. La iniciación (también llamada etapa preinflamatoria) corresponde a los primeros acontecimientos del proceso y comprende los cambios rápidos de la expresión genética y del fenotipo que permiten a las CEH responder a los estímulos paracrinos generados por células vecinas tales como leucocitos, hepatocitos y células de Kupffer<sup>74</sup>. Por su parte, en la perpetuación se desarrollan los acontecimientos celulares que amplifican el fenotipo activado por medio de los efectos crecientes de diversas citocinas autocrinas (TGF- $\beta$ , CTGF) y estímulos paracrinos que regulan y mantienen la activación de las CEH. Adicionalmente, en esta etapa se producen fenómenos de proliferación, fibrogénesis, contractilidad, liberación de citocinas, quimiotaxis y motilidad celular<sup>79</sup>.

Una vez que están activas, las CEH proliferan y migran hacia los focos de necrosis hepatocelular, donde depositan ME y participan en el reclutamiento de células inflamatorias, mediante la secreción de varias metaloproteasas (MMP2, MMP9 Y MMP3), que producen la desorganización de la membrana basal, permitiendo que las células inflamatorias puedan ser reclutadas fácilmente hacia el tejido dañado<sup>34,71,80-83</sup>. Asimismo, células de Kupffer activadas, linfocitos T y hepatocitos lesionados producen estrés oxidativo (aumento de ROS), liberan citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ) y factores de crecimiento (PDGF, CTGF, TGF- $\beta$ ) que potencian la acción profibrogénica<sup>78,80,84</sup>.

Además de amplificar la inflamación en las hepatopatías crónicas, las CEH son capaces de regular el flujo sanguíneo al rodear a los sinusoides hepáticos de forma circular, y además podrían estar estimulando fenómenos de angiogénesis debido a su estrecha relación anatómica con las células endoteliales del sinusoides y a que las CEH tienen la capacidad de secretar factores proangiogénicos como VEGF y angiopoyetina1 (Ang1)<sup>85,86</sup>.



**Figura 4. Esquema de la activación y diferenciación de las CEH a miofibroblastos.** Modificado de Gressner OA y Col. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. *J Cell Mol Med.* 2007 Sep-Oct; 11(5):1031-51.

## 2.3 Angiogénesis

La angiogénesis es un fenómeno natural y necesario para la reparación del tejido y el restablecimiento del flujo sanguíneo tras un daño o lesión tisular<sup>87</sup>. El

proceso angiogénico, mediante el cual se generan nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos ya existentes, no ocurre fisiológicamente en tejidos adultos (excepto en el ovario, endometrio y placenta) pero es esencial en la cicatrización de heridas y fenómenos inflamatorios<sup>87,88</sup>.

La angiogénesis se encuentra estrechamente regulada mediante el equilibrio entre diversos factores proangiogénicos y antiangiogénicos; en cambio, dicho balance se encuentra profundamente alterado en un gran número de enfermedades como psoriasis, artritis reumatoide, cirrosis biliar primaria (CBP) y otras hepatopatías crónicas<sup>36,89-96</sup>.

Los principales factores desencadenantes de procesos proangiogénicos son la hipoxia y la inflamación<sup>97,98</sup>. La hipoxia induce un incremento en la célula del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), que en el núcleo promueve por un lado la transcripción de diversos genes proangiogénicos (PDGF, VEGF, etc.)<sup>99,100</sup> y por otra parte, induce la estimulación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B que promueve la acción inflamatoria y la secreción de factores proangiogénicos como VEGF<sup>101,102</sup>. Estos factores proangiogénicos (VEGF y PDGF) activan a la proteína Akt a través de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K), que constituye una vía señalización crucial para que se active el endotelio ya que transmite señales de supervivencia, migración y proliferación a las CE<sup>103</sup>.

Otro factor que contribuye a la estimulación de angiogénesis es el incremento de ROS que produce un aumento de la expresión de TNF- $\alpha$ , Óxido nítrico (NO), HIF-1 $\alpha$  y VEGF<sup>104</sup>. La citocina TNF- $\alpha$ , producida por numerosos tipos celulares (macrófagos, linfocitos T, CE...) durante la inflamación puede activar la ruta de señalización, MAPK/ERK, vía de transducción de señales íntimamente

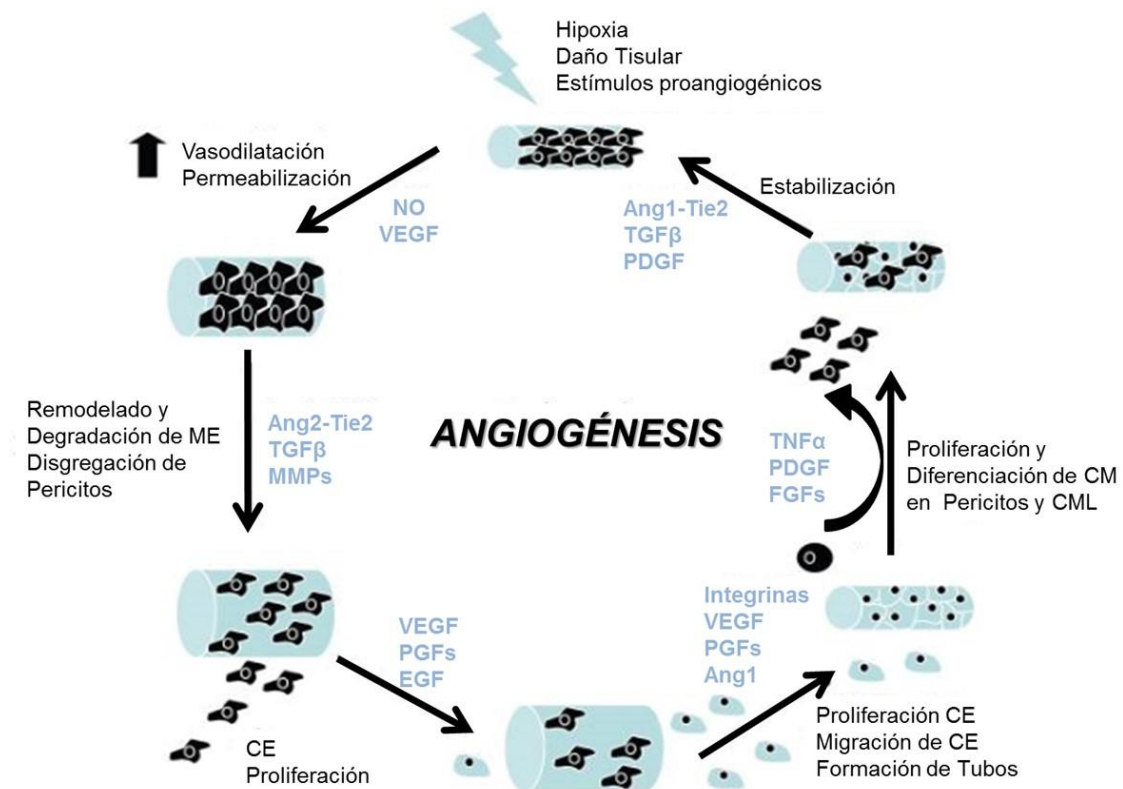
involucrada en la migración celular, inducción de proteasas y regulación de procesos de apoptosis<sup>105,106</sup>.

### 2.3.1 Mecanismos de angiogénesis

En relación a otros órganos, el hígado presenta ciertas peculiaridades en cuanto al proceso angiogénico. Por un lado, existen 2 tipos de estructuras vasculares hepáticas, grandes vasos (vénulas portales o centrales y arteriolas hepáticas) en las que las CE se alinean de forma continua y por otro, los sinusoides, formados por las células endoteliales particulares que forman las fenestraciones características<sup>107</sup>. Asimismo, las CEH, responsables del desarrollo de FH, podrían contribuir también a la angiogénesis a través de mecanismos diferentes de los atribuidos a los pericitos de los microcapilares. Hay que destacar que la angiogénesis fisiológica hepática ocurre durante la regeneración hepática, permitiendo la formación de nuevos sinusoides hepáticos; sin embargo, la desorganización angiogénica patológica genera estructuras vasculares capilarizadas con un incremento de ME. Por último, el hígado es el único órgano en el que se secreta un factor proangiogénico denominado angiopoyetina *like* 3, capaz de unirse a la integrina  $\alpha V\beta 3$ , lo que induce la estimulación de diferentes vías de transducción de señales como Akt o MAPK<sup>108</sup>, facilitándose la migración y adhesión de las CE.

Al igual que en otros órganos, la lesión hepática provoca la liberación de factores proangiogénicos tales como NO, VEGF, y FGF que inducen la activación de las CE de los vasos preexistentes próximos a la lesión, favoreciendo el aumento de la vasodilatación y la permeabilidad vascular del

endotelio<sup>36,109-111</sup>. La activación endotelial favorece el reclutamiento y el tránsito de las células del sistema inmune desde la circulación sanguínea al área lesionada. A su vez, estas células inflamatorias liberan factores proangiogénicos como VEGF, angiopoyetinas, FGF, PDGF, TGF- $\beta$  que tienen efectos mitogénicos y migratorios sobre el propio endotelio<sup>112-114</sup>. Paralelamente, se inicia la extravasación de proteínas plasmáticas que, junto con las proteínas de la ME facilitan la fijación de un andamio provisional para la migración de las CE. A continuación, la lámina basal (formada por colágeno IV y laminina) y la ME (colágeno I y elastina) en la que están ancladas las CE, son degradadas por la acción de MMPs. Simultáneamente, se produce una nueva ME para estabilizar los nuevos vasos sanguíneos que se están formando. El control del remodelado de la ME, tanto su degradación como la formación de nueva matriz, debe estar perfectamente regulado en el tiempo y en el espacio. Una vez que se ha degradado la ME, las CE migran y proliferan para formar el tubo del nuevo vaso sanguíneo<sup>115</sup>. El tamaño final del lumen del nuevo vaso depende de VEGF, Ang1 e integrinas ( $\alpha V\beta 3$   $\alpha V\beta 5$ ). Por último, bajo la influencia del factor TGF- $\beta$ , VEGF y PDGF, el vaso recién formado debe madurar y estabilizarse mediante el reclutamiento de los pericitos que rodean al endotelio (células de músculo liso) y la formación de una nueva lamina basal y ME<sup>115,116</sup> **(Figura 5)**.



**Figura 5. Fases del proceso de angiogénesis.** ME: Matriz extracelular, CE: Células endoteliales, CML: Células de músculo liso. (Modificado de Sanz-Cameno, et al. Angiogenesis: From Chronic Liver Inflammation to hepatocellular Carcinoma. Journal of Oncology 2010).

La fase final de estabilización es esencial para una correcta angiogénesis; en su regulación juega un importante rol a las angiopoyetinas, Ang1 y Ang2, que también son importantes en las etapas iniciales de la angiogénesis. La proteína Ang1, al unirse a su receptor, Tie2, conduce a que los capilares recién formados se encuentren en estado de reposo y presenten un fenotipo estable<sup>117</sup>; en cambio, un exceso de expresión de Ang1 aumenta la rigidez vascular e impide la ramificación de los capilares. Por el contrario, la función de Ang2, parece tener un papel condicional en función de la presencia de otros factores como VEGF: en ausencia de VEGF, Ang2 contribuye a desestabilizar

los vasos sanguíneos y provoca la regresión vascular; sin embargo, si se encuentra presente VEGF, la ramificación de los vasos se favorece<sup>118,119</sup>.

También, se ha observado que en pacientes con HCC las CE forman nuevas estructuras vasculares en asociación con los infiltrados inflamatorios en áreas periportales, originándose una progresiva capilarización de los sinusoides lo que induce a un deterioro de la difusión de oxígeno desde los sinusoides a los hepatocitos con la consiguiente activación de vías proangiogénicas<sup>88,120</sup>.

En el caso concreto de la progresión de la HCC, existen numerosas evidencias que demuestran la importancia fisiopatológica de la angiogénesis después de un daño hepático<sup>88,121</sup>. No obstante, los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de angiogénesis en la HCC no han sido identificados en su totalidad. Muchas de las moléculas que se han demostrado *in vitro* o en animales de experimentación que participan en la respuesta angiogénica se sobreexpresan en el hígado de pacientes con HCC. Los pacientes con HCC se caracterizan por tener elevadas concentraciones en suero de proteínas angiogénicas tales como PIGF y Ang2<sup>122,123</sup>. Además, se ha determinado, en muestras de tejido hepático, que el número de nuevos vasos formados correlaciona positivamente con el estadio de fibrosis y grado de actividad inflamatoria<sup>124</sup>. De forma interesante, se ha comprobado que los niveles en suero elevados de VEGF, Ang2 y Tie2 soluble (Tie2s) de pacientes con HCC se reducen significativamente después de la terapia antiviral combinada<sup>125</sup>.

Por último, las MMPs y sus inhibidores no solamente son relevantes en la fibrogénesis y/o la invasión tumoral sino que tienen un papel esencial en el desarrollo de la angiogénesis hepática durante la HCC al contribuir a la

migración y proliferación de las CE activadas, mediante el control del remodelado y degradación de la ME<sup>125</sup>.

### 2.3.2 Sistema angiopoyetinas/Tie2

Entre los sistemas de señalización implicados en el crecimiento y estabilización de los vasos sanguíneos, el sistema angiopoyetinas/Tie2 juega un papel esencial<sup>126,127</sup>, por lo que su estricta regulación es fundamental en situaciones de inflamación, remodelado y reparación tisular<sup>128</sup>. Ambas angiopoyetinas, Ang1 y Ang2, median su señalización a través del mismo receptor con actividad tirosín-cinasa denominado Tie2<sup>129</sup>. La fosforilación de Tie2 por parte de Ang1 induce diferentes cascadas de señalización celular (PI3K/Akt,...) que activan diversas proteínas efectoras cuya finalidad es el control de la quiescencia vascular y la supresión de la migración endotelial<sup>117,130,131</sup>. La activación de Tie2 también promueve al reclutamiento del inhibidor del factor nuclear NF- $\kappa$ B protegiendo a las CE de la apoptosis mediante la inhibición de respuestas inflamatorias<sup>132</sup>.

Por el contrario, el papel de Ang2 es desestabilizar el endotelio vascular al unirse a Tie2 y bloquear su autofosforilación, inhibiendo la señalización de Ang1/Tie2<sup>133,134</sup>, lo que sugiere el papel de Ang2 como un regulador negativo del endotelio en estado quiescente, funcionando como un interruptor que controla la transición del endotelio quiescente al endotelio de respuesta activada<sup>118,119</sup>. El papel de Ang2 es esencial en los procesos inflamatorios ya que amplifica las respuestas inflamatorias mediante la sensibilización de las CE por la acción de las citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  y IL-1)<sup>126,135</sup> y también



porque es capaz de iniciar y dirigir de forma independiente el proceso de inflamación al promover el reclutamiento de células de la serie mieloide (neutrófilos, monocitos) a la zona dañada mediante su interacción con moléculas de adhesión celular (integrinas  $\beta 2$ ) de las CE<sup>136,137</sup>.

Por tanto, el equilibrio de las señales generadas por Ang1 y Ang2 es crucial para que se produzca una correcta plasticidad vascular; sin embargo, ésta se encuentra notablemente alterada en múltiples patologías inflamatorias crónicas del hígado, tal como sucede en la CBP, HCB, así como en el CHC, tumor que se caracteriza por su elevada vascularización<sup>88,93,95,134,138-140</sup>.

En la actualidad, existen numerosos estudios que demuestran que se produce un aumento de la expresión de Ang2 en condiciones patológicas, tanto en tumores malignos, como en condiciones inflamatorias crónicas (psoriasis, hemangiomas, enfermedad inflamatoria intestinal)<sup>118,141,142</sup>. En tumores hepáticos se observa una sobreexpresión de Ang2 en las zonas tumorales en comparación con el tejido no tumoral adyacente; en cambio, la expresión de Ang1 es equivalente en ambas zonas<sup>143</sup>. En pacientes con HCC, también se ha visto un aumento de la expresión de Ang2 responsable de una desregulación de la respuesta inmunológica y un deficiente remodelado tisular<sup>124,125,136,137,144,145</sup>.

## **2.4 Influencia de las proteínas virales en la progresión de la HCC**

Las proteínas del VHC están estrechamente involucradas en el inicio y la progresión de la HCC, favoreciendo un estado proinflamatorio asociado a fenómenos angiogénicos y fibrogénicos<sup>146</sup>.

Por un lado, las proteínas virales NS3-4 favorecen la persistencia del VHC frente a la respuesta innata al bloquear los receptores citosólicos TLR3 y RIG. Además, las proteínas Core y NS5A inhiben la señalización del IFN a través de la vía JAK/STAT<sup>147</sup>. Por su parte, la proteína E2 tiene la capacidad de bloquear las funciones de las NK y, junto a NS5A, inhibe un efector antiviral denominado PKR que se encarga de la inhibición de la transcripción de proteínas de las células infectadas<sup>147</sup>. Asimismo, Core y E1 provocan una maduración defectuosa de las CD, lo que disminuye su capacidad para inducir la respuesta inmune celular al reducir la producción de IFN<sup>148</sup>. Por otra parte, la unión de la proteína Core a las CD conduce a la disminución de la producción de IL-12 que produce la diferenciación de células T CD4+ hacia un fenotipo Th2<sup>149</sup>. También, se ha descrito que las proteínas virales NS3, NS4 y NS5 al interactuar con células de Kupffer inducen la liberación de otras citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ <sup>150</sup>. A su vez, el TNF- $\alpha$  induce la liberación de otras citocinas a través de las células de Kupffer (IL-1 e IL-6), desempeñando un destacado papel en la inflamación y el remodelado de la ME. En la actualidad se han realizado estudios que han revelado que se produce un incremento de la expresión de TNF- $\alpha$  en monocitos de pacientes con HCC mediado por Core, NS3 y NS5A<sup>151</sup>. Asimismo, NS5A promueve una sobreexpresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) que favorece la síntesis de prostaglandinas, en concreto la prostaglandina-2 (PGE-2), que va a contribuir a la permeabilización vascular y a la migración de leucocitos a la área inflamada<sup>146,152</sup>.

A su vez, las proteínas virales (Core, NS5, etc.) pueden inducir FH al ser las responsables de iniciar una cascada de eventos moleculares que dan lugar a la producción de ROS en hepatocitos<sup>153</sup>. Estas proteínas virales afectan tanto a la

acumulación como degradación de lípidos, lo que genera una desorganización del proceso normal de compartimentalización y metabolismo de los mismos, provocando que las células tengan un estado redox diferente que induce una reactividad celular distinta, cuya consecuencia final es el aumento de la producción de ROS y la activación de rutas de señalización intracelular<sup>154-156</sup>. En concreto, la inducción de estrés oxidativo en hepatocitos es modulado por la acción de varias proteínas del VHC: Core<sup>157,158</sup>, E1<sup>157</sup>, E2<sup>159</sup>, NS3/4A<sup>160</sup>, NS4B<sup>161</sup>, NS5A<sup>162</sup>, siendo Core el más potente regulador del estrés oxidativo<sup>157</sup>. También se ha visto que el incremento de ROS inducido por Core activa a su vez la proliferación de CEH y la síntesis de colágeno y TGF- $\beta$ <sup>163,164</sup>, poniéndose en funcionamiento diversas vías de señalización como ERK, p38, JNK, rutas fundamentales en procesos de apoptosis, crecimiento, y diferenciación celular<sup>165</sup>.

Por otro lado, Core y E2, son capaces de inducir un desequilibrio en la degradación de la ME, al modular la expresión de diversas MMPs. La proteína viral E2 al interaccionar con el receptor de superficie CD81 presente en las CEH promueve un aumento de la expresión de MMP2<sup>166</sup>, cuya función principal es la destrucción de ME, favoreciendo el desarrollo del infiltrado inflamatorio y el progreso de la FH<sup>167</sup>. Además, las proteínas NS (NS3-NS5), al igual que Core, serían responsables de la estimulación de la fibrogénesis mediante la activación del factor de crecimiento TGF- $\beta$  liberado por las CEH activadas<sup>152,165</sup>.

A pesar del claro vínculo entre el VHC y los fenómenos angiogénicos, se conoce muy poco acerca de los mecanismos moleculares que utiliza el VHC para inducir angiogénesis en el hígado. *Nasimuzzaman y col*<sup>168</sup> mostraron, *in*

*vitro*, que la infección del VHC promueve la estabilización de HIF-1 $\alpha$  debido a la expresión de los genes virales que codifican a las proteínas NS en condiciones normóxicas. El VHC induce estrés oxidativo (ROS) para mimetizar las condiciones hipóxicas lo que favorece indirectamente la estabilización de HIF-1 $\alpha$ . Además, el incremento de ROS activa varias rutas de transducción de señales tan importantes como, PI3K, P42/44 MAPKs, STAT3 y NF- $\kappa$ B<sup>162</sup>, vías de señalización que contribuyen a la estabilización de HIF-1 $\alpha$  y por tanto a su activación. Asimismo, el incremento de ROS y STAT3 estimula la replicación del virus<sup>169</sup> y a su vez, el factor HIF-1 $\alpha$  activado estimula la expresión de VEGF y de otros factores angiogénicos<sup>168</sup>. Además de las proteínas NS, se ha demostrado que la proteína estructural Core es capaz de estimular también la sobreexpresión del factor angiogénico VEGF mediante las rutas de señalización JNK, P38 o MAPK<sup>165,170</sup>. Asimismo, se ha demostrado que pacientes con HCC presentan un incremento de expresión de MMP9, inducido por la proteína viral E2, que favorece un desequilibrio en la migración y proliferación de las CE activadas<sup>152,166</sup>.

## **2.5 Marcadores angiogénicos**

La estrecha relación que se produce entre inflamación y angiogénesis en el transcurso de una hepatopatía crónica ha impulsado la búsqueda de factores angiogénicos para ser utilizados como biomarcadores de la progresión de la enfermedad y de pronóstico para monitorizar la respuesta al tratamiento. El uso de estos factores angiogénicos presenta diferentes ventajas: la más importante es que es para su análisis no es necesario aplicar ninguna técnica invasiva,

con la extracción de una muestra sanguínea del paciente es suficiente; además, el procedimiento de determinación es fácil, ya que normalmente se utilizan métodos protocolizados (ensayos de ELISA).

Numerosos estudios en pacientes y sujetos sanos han demostrado que los niveles séricos de varios factores proangiogénicos, en particular VEGF, se elevan en los pacientes respecto a los sujetos sanos y aumentan en fases avanzadas de la enfermedad<sup>171,172</sup>. En el caso concreto del CHC, también se ha visto un incremento de la expresión de VEGF asociado a etapas avanzadas de la hepatocarcinogénesis y la posible utilidad de VEGF como un factor predictivo de supervivencia<sup>173</sup>. En otro estudio de 39 pacientes con HCC, se encontró una correlación positiva entre los niveles en suero de Tie2s y el tamaño del tumor<sup>174</sup>. Asimismo, *Mitsuhashi y col*<sup>175</sup>, observaron en pacientes con CHC que el aumento del ratio Ang2/Ang1 se relacionaba con la invasión tumoral de la vena porta y el diámetro del tumor.

Desafortunadamente, los estudios que investigan el papel de los factores proangiogénicos en la progresión de la HCC siguen siendo escasos. En un estudio previo, nuestro grupo evaluó los niveles séricos de varios factores solubles proangiogénicos (VEGF, Ang2 y Tie2) en 36 pacientes con HCC y 15 controles sanos. Los resultados mostraron un aumento de la expresión de los 3 marcadores proangiogénicos en los pacientes con HCC en comparación con los sujetos control. Además, los niveles en suero de estos marcadores angiogénicos disminuyeron significativamente después de recibir los pacientes la biterapia antiviral (IFN- $\alpha$ -2b pegilado más ribavirina)<sup>125</sup>. De forma similar, *Vespasiani-Gentilucci y col*<sup>145</sup>, determinaron la expresión en suero de Ang2 y VEGF, antes y después del tratamiento antiviral, en pacientes con HCC y

controles sanos; los pacientes mostraron niveles séricos incrementados de Ang2 con respecto a los controles y una reducción progresiva y significativa post-tratamiento ( $p < 0.01$ ).

Estos hallazgos indican que el análisis de factores proangiogénicos en el suero de pacientes con HCC, y en particular del sistema angiopoyetinas/Tie2, podría proporcionarnos una valiosa información para el pronóstico y seguimiento de la progresión de la enfermedad así como para monitorizar la respuesta al tratamiento<sup>140</sup>.

### **3. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE FIBROSIS HEPÁTICA**

La FH y la cirrosis son las principales responsables de la morbilidad y mortalidad de la HCC<sup>176</sup>; por lo tanto, la valoración de la fibrosis es primordial a la hora de evaluar la gravedad de la enfermedad, el pronóstico, la necesidad de tratamiento y el manejo adecuado de muchos pacientes con esta hepatopatía crónica<sup>177</sup>. En la práctica diaria es necesario cuantificar la magnitud de la FH y por eso es necesaria una herramienta segura y eficaz de diagnóstico<sup>177</sup>. En la actualidad, los métodos usados para la evaluación de la progresión de la FH se dividen en invasivos (biopsia hepática percutánea (BH), y estudios inmunohistoquímicos) y no invasivos (biomarcadores directos, biomarcadores indirectos, métodos de imagen, etc.)<sup>178</sup>.

### 3.1 Biopsia hepática

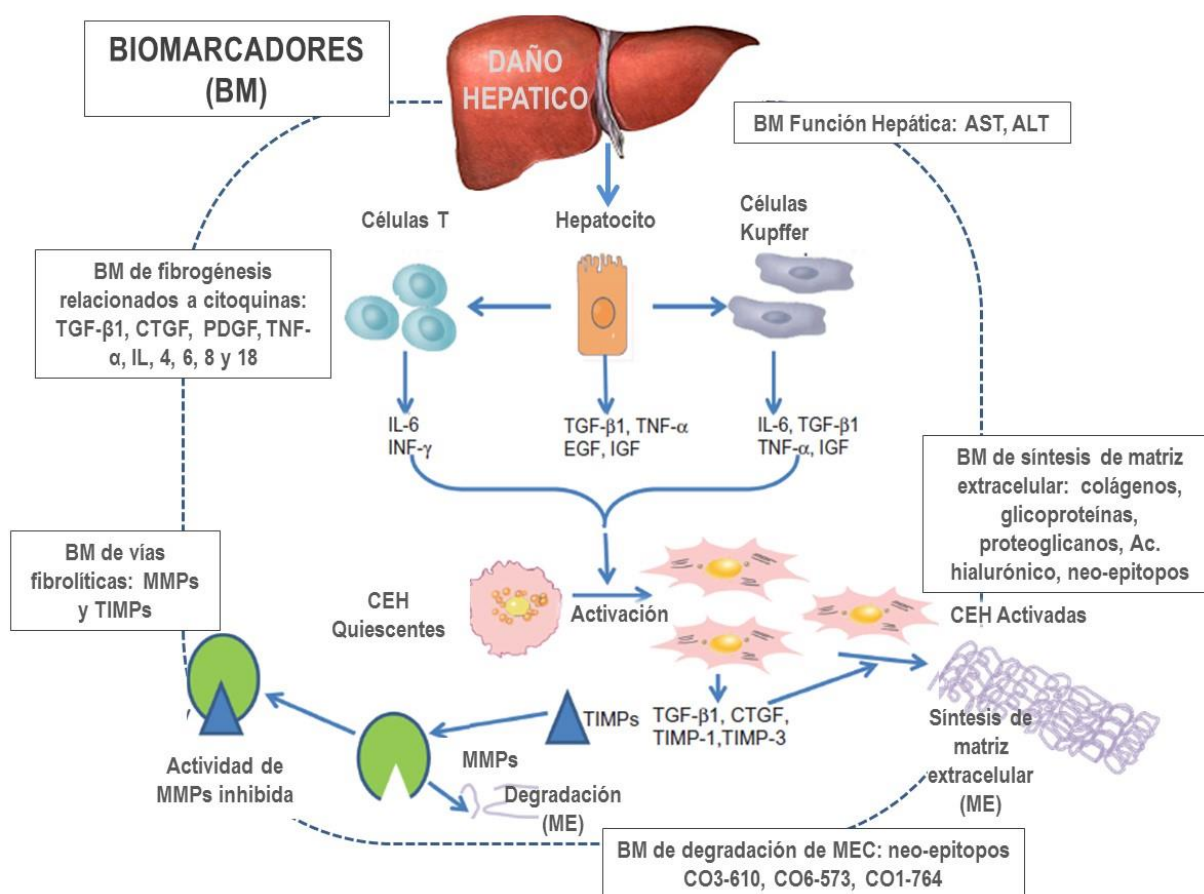
La BH continúa siendo el estándar de referencia como herramienta fundamental en el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades hepáticas<sup>179</sup> debido a que proporciona información no sólo sobre el grado de fibrosis, sino también sobre la actividad necroinflamatoria, el grado de esteatosis del paciente y sobre la causa del trastorno hepático<sup>177,180</sup>. No obstante, para que la BH sea considerada efectiva, se requiere un correcto procesamiento de la muestra y de un observador experimentado para su idónea interpretación<sup>181,182</sup>. Además, la BH también presenta inconvenientes como son su elevado coste, invasividad y complicaciones que determinan un cierto grado de morbi-mortalidad<sup>183</sup>. Otras limitaciones son la imposibilidad de evaluar al paciente con la frecuencia necesaria, un cierto error de muestreo y una variabilidad en la interpretación histológica, tanto intra como interobservador<sup>179</sup>. Tampoco existe consenso sobre cuándo y a qué pacientes se debe proponer una BH y bastantes de ellos la rechazan por sus potenciales riesgos<sup>184</sup>. Por otro lado, la precisión de la BH para valorar eficazmente la fibrosis disminuye en aquellos pacientes con una fibrosis avanzada<sup>185,186</sup>. La interpretación de la BH se determina mediante el empleo de sistemas o escalas de puntuación semicuantitativos (valor numérico) que son útiles para clasificar el grado de inflamación y el estadio de fibrosis. Existe varias clasificaciones histológicas para cuantificar el estadio de FH, siendo en la práctica clínica la escala METAVIR una de las más utilizadas<sup>182,187</sup>. La escala METAVIR se utiliza frecuentemente porque presenta varias ventajas, como su simplicidad relativa,

su enfoque sobre lesiones necroinflamatorias, y su sensibilidad incrementada en la fibrosis<sup>188-190</sup>.

### **3.2 Métodos no invasivos para la evaluación de fibrosis hepática**

Las mencionadas limitaciones e inconvenientes asociados a la BH han estimulado la búsqueda y el desarrollo de nuevas técnicas no invasivas y biomarcadores que permitan cuantificar la magnitud de la fibrosis hepática y predecir su evolución de la manera más exacta y menos lesiva posible<sup>191,192</sup> (**Figura 6**). Numerosos estudios han identificado diferentes marcadores biológicos en suero (directos e indirectos) y métodos físicos, como la elastografía de transición, que ofrecen una alternativa atractiva y rentable a la BH<sup>191,193,194</sup>.





**Figura 6. Mecanismos de fibrogenesis hepática y posibles biomarcadores moleculares de suero.** Adaptado de Liu T y Col. Molecular serum markers of liver fibrosis. *Biomark Insights*. 2012; 7:105-17.

Desde un punto de vista práctico, el objetivo de la investigación de los marcadores no invasivos es discriminar entre pacientes sin fibrosis, con fibrosis leve (F1 de METAVIR) y con fibrosis significativa (F2 a F4 de METAVIR) sin necesidad de practicar una BH.

Los marcadores serológicos son clasificados en dos grandes grupos: por un lado, aquellos que detectan modificaciones en el remodelado de la ME (marcadores directos)<sup>195</sup>, por otro lado, aquellos que aportan información sobre las alteraciones de la función hepática (marcadores indirectos)<sup>196</sup>.

La mayor limitación de los métodos no invasivos radica en la menor capacidad para diferenciar entre los estadios de fibrosis intermedios (F1-F2), que en el caso de la HCC puede tener una importante repercusión en la toma de decisiones terapéuticas. Por otro lado, estos marcadores no son específicos del hígado y sus concentraciones séricas pueden ser elevadas en sitios donde también se produce inflamación. Por último, las concentraciones séricas de los marcadores dependen de las tasas de aclaramiento, las cuales están influidas por la disfunción endotelial, daño de la excreción biliar o de la función renal<sup>197</sup>.

### 3.2.1 Marcadores directos

Este grupo de marcadores comprende los productos generados como consecuencia de la activación de las CEH, como son los componentes de la ME (péptido procolágeno tipo I, péptidos procolágeno tipo III, colágeno tipo IV<sup>198,199</sup>, ácido hialurónico<sup>200,201</sup>, enzimas relacionadas con la degradación de la ME (MMPs, TIMPs)<sup>202</sup> citocinas (TGF- $\beta$ , PDGF)<sup>200,203</sup>. La mayor limitación de los marcadores directos es que solo reflejan parcialmente la tasa de recambio de la ME (no sólo de deposición) y tienen una tendencia a ser más elevada cuando se asocia con la actividad inflamatoria alta; como consecuencia de ello, la deposición extensa de la matriz podría no ser detectada en la presencia de inflamación mínima<sup>197</sup>. Hay diversos estudios que abordan estos marcadores, pero su aplicación clínica no se ha extendido ya que solamente un reducido número de ellos tiene relevancia diagnóstica<sup>204</sup>.

### 3.2.2 Marcadores indirectos

Los marcadores indirectos que evalúan la fibrosis hepática son marcadores serológicos bioquímicos que reflejan alteraciones en la función hepática y hematológica y pueden identificar o excluir con precisión a pacientes con enfermedad hepática avanzada. Entre ellos encontramos las pruebas de función hepática [transaminasa glutámico-oxalacética (AST); transaminasa glutámico pirúvica (ALT); fosfatasa alcalina (FA); gammaglutamil transpeptidasa (GGT); bilirrubina total]; el perfil lipídico (colesterol total, triglicéridos), la albúmina, el recuento de plaquetas, el tiempo de protrombina y los tradicionales marcadores séricos de inflamación (haptoglobina,  $\alpha$ 2-macroglobulina y apolipoproteína-A1). Los marcadores indirectos son los que más se correlacionan con la FH; sin embargo, su mayor limitación es la de no tener suficiente sensibilidad para clasificar correctamente a pacientes con escasa fibrosis hepática (F0-F2).

Recientemente, se ha ido extendiendo la combinación de múltiples parámetros bioquímicos, seleccionados mediante análisis de regresión logística multivariante, para el desarrollo de índices no invasivos que mejoran la capacidad predictiva, aunque continúan discriminando mal los estadios intermedios de fibrosis hepática<sup>204-206</sup>.

El análisis para determinar la calidad diagnóstica de los índices construidos se realiza en base a curvas ROC (curvas de rendimiento diagnóstico) y la comparación de diferentes pruebas diagnósticas mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC-ROC). Las curvas ROC representan en un sistema de coordenadas el nivel de sensibilidad y especificidad que obtenemos en cada

punto de corte de la variable, siendo la sensibilidad la proporción de individuos positivos en el test clasificados de forma adecuada y la especificidad la proporción de individuos no positivos en el test clasificados correctamente<sup>207</sup>. Un índice no invasivo ideal sería aquel que tuviera un AUC-ROC de 1.0 y un punto de corte con un 100% de sensibilidad y especificidad. No obstante, la mayoría de marcadores bioquímicos propuestos hasta el momento tienen un AUC que oscila entre 0.8-0.85 y no tienen un valor para la estadificación de la enfermedad, sino más bien para diferenciar la fibrosis leve ( $F<2$ ) de la fibrosis significativa ( $F2-F4$ )<sup>196,202</sup>. Los resultados del test diagnóstico se deben validar en un grupo diferente de pacientes (Grupo de Validación) y contrastarlo con el grupo original para respaldar la reproducibilidad de la prueba diagnóstica. Entre los índices no invasivos de mayor relevancia diagnóstica que se han construido, destacan FibroTest (FT), APRI y Forns. FT se basa en la combinación de varios parámetros bioquímicos asociados a la progresión de la FH ( $\alpha 2$ -macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteína A1, GGT, bilirrubina Total), edad y sexo; sin embargo, se encuentra protegido por una patente y tiene una disponibilidad más limitada<sup>205,208,209</sup>. El índice de Forns es un modelo matemático basado en los valores de colesterol, GGT, recuento de plaquetas y la edad. Este método puede ser usado para diferenciar entre pacientes con fibrosis leve ( $F0-F1$ ) y fibrosis avanzada ( $F3-F4$ ) pero es menos preciso para distinguir fibrosis en etapas intermedias<sup>210</sup>. Por último, APRI se calcula utilizando únicamente 2 variables bioquímicas de rutina: aspartato aminotransferasa (AST) y el recuento de plaquetas<sup>205</sup>. No obstante, tampoco demuestra mucha eficacia para discriminar entre estadios intermedios de fibrosis<sup>211,212</sup>.

### 3.2.3. Elastografía de transición

El uso de la elastografía de transición (ET) en pacientes con patologías hepáticas para la valoración correcta de la FH es el método no invasivo que mejores resultados ha ofrecido hasta el momento. La ET se basa en la medición de la rigidez o elasticidad de un tejido mediante la emisión de un pulso mecánico de vibración que se transmite a través de los tejidos. El método comercializado que utiliza la ET se denomina FibroScan® (FS)<sup>213</sup>. Esta técnica es útil para identificar a aquellos pacientes con fibrosis significativa y cirrosis hepática (F4) en diferentes enfermedades crónicas del hígado<sup>214,215</sup>; asimismo, tiene una buena correlación con otros indicadores directos e indirectos de fibrosis como FT, APRI, AH y el colágeno tipo IV en pacientes con infección crónica por el VHC<sup>216-218</sup>. Los metanálisis publicados sugieren que FS es una herramienta útil, fácil, no invasiva, y con un área bajo la curva (AUC-ROC) con valores altos para el diagnóstico de cirrosis (F0-3 vs. F4) de 0.95<sup>215,219-221</sup>.

A pesar de ser una prueba rápida y segura, FS presenta varias limitaciones, entre las que cabe mencionar la dificultad de la medición de la rigidez del hígado en pacientes obesos o con un espacio intercostal estrecho, y puede ser imposible la medición en pacientes con ascitis<sup>222,223</sup>. Por otro lado, se pueden obtener falsos positivos en pacientes con congestión venosa por fallo cardíaco<sup>224</sup>, con hipertensión biliar secundaria a colestasis extrahepática<sup>225</sup>. Por último, con el objetivo de mejorar la exactitud diagnóstica de los métodos no invasivos como técnica de referencia de fibrosis, se ha analizado al FS en combinación con el FT en un estudio que incluía 183 pacientes con hepatopatía por virus C<sup>226</sup>; esta combinación obtuvo un AUC de 0.88 para F>2, 0.95 para

$F > 3$ , 0.95 para  $F > 4$  lo que permitió evitar la BH en la mayoría de los pacientes evaluados. Por tanto, es probable que la combinación de los biomarcadores serológicos y las pruebas de imagen se complementen recíprocamente, para mejorar la precisión de la detección de FH. No obstante, estas combinaciones requieren una mayor inversión económica en equipamiento y personal especializado.

En resumen, los métodos no invasivos (combinación de marcadores séricos y FS) representan una alternativa verdaderamente útil en la práctica clínica diaria para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con fibrosis avanzada, CH y pacientes con escasa fibrosis<sup>227</sup>; asimismo, son fundamentales en aquellos pacientes que les sea contraindicado la BH. No obstante, las limitaciones técnicas de estos procedimientos hacen que la BH siga siendo indispensable para clasificar correctamente a pacientes que presenten fibrosis en estadios intermedios. Por ello, la identificación de nuevos biomarcadores mínimamente invasivos, más económicos y fiables sigue siendo prioritario para poner el tratamiento y seguimiento más adecuado de estos pacientes.

---

---

## HIPÓTESIS

*“Cada cual es como Dios le ha hecho, pero llega a ser como el mismo se hace.”*

*Miguel Servet (1511-1553).*

## II. HIPÓTESIS

El conocimiento del estadio de FH es esencial para evaluar el pronóstico y el tratamiento de los pacientes con HCC. Desde hace varias décadas la BH es el estándar de referencia utilizado para su estadificación aunque este procedimiento conlleva importantes complicaciones asociadas a su invasividad. Por lo tanto, el hallazgo de nuevos marcadores serológicos para detectar las diferentes etapas de la progresión de la enfermedad sería muy valioso.

En la actualidad, existen evidencias que sugieren que la infección crónica por el VHC origina un profundo desequilibrio de la homeostasis vascular que favorece la progresión de la HCC. Debido a que el sistema Angiopoyetinas/Tie2 es una ruta de señalización esencial en la regulación de la quiescencia vascular postulamos que los niveles periféricos de las angiopoyetinas podrían estar notablemente alterados en el curso de la HCC y constituir una valiosa herramienta diagnóstica como biomarcadores no invasivos de progresión de la enfermedad.

Asimismo, el análisis de los niveles periféricos de estos factores, junto a otras variables clínicas y demográficas relacionadas, podría permitir el desarrollo de modelos matemáticos de gran utilidad para la monitorización mínimamente invasiva de la FH, y por tanto, para el manejo clínico de los pacientes con HCC. Por último, el estudio de la influencia de la infección por VHC en la expresión de las angiopoyetinas puede constituir un considerable avance para el entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a la patogenia de la enfermedad que permitan el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.



---

---

## OBJETIVOS

*“La naturaleza nos ha dado las semillas del conocimiento, no el conocimiento mismo.”*

*Lucio Anneo Séneca (2 A.C.-65).*

### **III. OBJETIVOS**

1. Estudiar el desequilibrio angiogénico que se produce durante el desarrollo de la HCC mediante la determinación de los niveles intrahepáticos de las proteínas Ang1 y Ang2 en pacientes con HCC y controles sanos.
2. Analizar si en suero de pacientes con HCC existe también una posible asociación entre los niveles séricos de Ang1 y Ang2 con la progresión de la HCC, especialmente con el grado de inflamación y el estadio de fibrosis.
3. Desarrollar un modelo matemático para predecir de forma mínimamente invasiva el estadio de FH en pacientes con HCC a partir de las principales variables relacionadas con la fibrosis.
4. Evaluar la influencia de las distintas proteínas del VHC (estructurales y NS) en la expresión de las angiopoyetinas y promoción de la angiogénesis patológica asociada a la progresión de la HCC.

---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

*“Sólo el que sabe es libre y más libre el que más sabe. No proclaméis la libertad de  
volar, sino dad alas.”*

*Miguel de Unamuno (1864-1936).*

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. PACIENTES Y SUJETOS CONTROL

En el presente estudio se seleccionaron muestras de pacientes con diagnóstico de HCC y de sujetos sin enfermedad hepática (controles sanos) procedentes del archivo de biopsias de la Unidad de Hepatología, del Hospital Universitario de La Princesa.

La presencia del virus en los pacientes se confirmó mediante la detección del ARN del VHC en suero y por la cuantificación de la viremia (Kit de diagnóstico *Cobas Amplicor Hepatitis C Monitor Test, v2.0 Roche Diagnostics, Mannheim, Germany*). El genotipo viral se determinó mediante el test *INNO-Lipa HCV (Innoetics, Gent, Belgium)*. Todos los pacientes seleccionados mostraron resultados negativos para las pruebas de anticuerpos contra el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y no se detectó presencia de enfermedad crónica hepática conocida de otra etiología (alcohol, autoinmune, tóxica, hígado graso no alcohólico, enfermedades por depósito, etc.), ni se observó reactividad de autoanticuerpos en ninguno de los pacientes o controles incluidos en este estudio.

El protocolo se sometió y fue autorizado por el Comité Ético del Hospital Universitario de La Princesa y se llevó a cabo de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki. Los pacientes incluidos en el presente estudio firmaron su consentimiento informado para autorizar la utilización de parte de su muestra con fines de investigación.

A todos los pacientes seleccionados se les había realizado una BH con fines diagnósticos. Las biopsias fueron realizadas mediante técnica percutánea ecodirigida con aguja de Menghini (HEPAFIX) y presentaron una mediana de longitud de 1,90 mm [1.78-2.02 (95% de IC)]. Cada BH fue examinada por el mismo patólogo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de La Princesa (Dra. Asunción García Sánchez) y se determinó el grado de inflamación y el estadio de fibrosis, mediante la escala METAVIR<sup>182</sup>. Esta escala incluye dos puntuaciones independientes, una para actividad necroinflamatoria (A) y otra para fibrosis (F). El grado es un número basado en el grado de inflamación, el cual es usualmente puntuado de 0-3, con A0 = ausencia de actividad, A1 = actividad leve, A2 = actividad moderada y de A3 = actividad grave. El grado de actividad es evaluado por la integración de la gravedad tanto de la necrosis periportal como de la necrosis lobular. La puntuación de la fibrosis es definida como: F0 = sin fibrosis; F1 = fibrosis periportal, sin septos; F2 = fibrosis periportal con pocos septos; F3 = numerosos septos sin cirrosis; F4 = fibrosis avanzada o cirrosis<sup>182</sup>.

### **1.1 Muestras de tejido hepático de pacientes con HCC y sujetos control**

Un total de 47 pacientes con HCC otorgaron su consentimiento informado por escrito autorizando la donación de parte de la muestra de tejido hepático para investigación. Adicionalmente, se seleccionaron 8 muestras de tejido hepático de sujetos no infectados por VHC y sin evidencias de actividad necroinflamatoria al diagnóstico, procedentes del archivo del hospital. Todas las muestras de tejido hepático adquiridas para fines de investigación fueron

almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se descongelaron y lisaron mecánicamente en frío mediante el uso de solución de RIPA (*Tris-HCl 50mM, NaCl 150 mM; 10% SDS 0,1 ml, Deoxicolato 0,05g NP40 100 UI*) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete, Roche Applied Science, Indianápolis, IN*), para obtener homogenados hepáticos a partir de los cuales se extrajo sobrenadantes en los que se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (Bio-Rad, Hércules, CA). Estos extractos se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior evaluación mediante *Western Blotting* y ensayos de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

## **1.2 Muestras séricas de pacientes con HCC**

El mismo día de la realización de la BH se practicaba una extracción sanguínea para los procedimientos de rutina habituales del Servicio de Digestivo y una muestra suplementaria (10 mL) para investigación. Esta muestra adicional se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos para la extracción del suero que se alicuotó y almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis mediante ensayos de ELISA, evitando ciclos de congelación/descongelación.

## **2. LINEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO**

Se analizó la expresión de Ang2 en replicones del VHC, partículas no infectivas del VHC con la capacidad de replicarse de manera autónoma en la línea celular de hepatoma humano (Huh7). Estos replicones fueron cedidos por el Dr. Aldabe (Universidad de Navarra, Navarra, España).

Los replicones consisten en transfectar establemente la región genómica completa del VHC (replicones VHC-C1 y VHC-C5) o las regiones subgenómicas no estructurales (replicones subgenómicos VHC-NS18 y VHC-NS19) a la línea celular Huh7 (**Anexo I**).

Las líneas celulares se cultivaron a una densidad ~50000 células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo modificado de *Dulbecco* (DMEM, *Biological Industries, Beit Haemek, Israel*), suplementado con 10% FBS, 5Mm L-glutamina, 2mM estreptomycin y 100 U/ml de penicilina en una atmósfera a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. La selección de los replicones transfectados con el VHC se realizó con el antibiótico bactericida Geneticina (G-418), que inhibe la síntesis de proteínas en las células no transfectadas con los replicones virales.

Para los experimentos de inhibición de las rutas de señalización celular PI3K y MAPK, los replicones del VHC, a un 70% de confluencia, se incubaron con los inhibidores Ly294002 (*PI3 Kinase Inhibitor*) y PD98059 (*MEK1 Inhibitor*) a una concentración de 25 µM respectivamente, durante 24 horas. A continuación se utilizó Solución RIPA (*Tris-HCl 50mM, NaCl 150 Mm, 10% SDS 0,1 ml, Deoxicolato 0,005g NP40 100U*) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete, Roche Applied Science, Indianápolis, IN*) y se dejó actuar durante 15 minutos en hielo para la extracción de proteínas. Los lisados celulares obtenidos se centrifugaron durante 20 min a 14,000 rpm a 4°C, desechando el precipitado y recogiendo el sobrenadante para medir las concentraciones de proteínas totales por el método de Bradford (*Bio-Rad, Hércules, CA*). Los lisados se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis por *Western Blotting* y ensayos de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

### 3. WESTERN BLOTTING

Los lisados celulares y los extractos de tejido hepático se resolvieron en geles de SDS-PAGE de tipo discontinuo (gel concentrante y gel separador) sometidos a electroforesis vertical. El porcentaje de poliacrilamida utilizado fue del 10% en condiciones reductoras ( $\beta$ -Mercaptoetanol). La transferencia del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa (*Bio-Rad, Hércules, CA*) se hizo a 100 voltios durante 1 hora a 4°C. Después, se bloqueó la membranas de nitrocelulosa durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución compuesta de leche desnatada en polvo a 7,5% disuelta en TBS (Tris-HCl 50 Mm pH 7,5, NaCl 150 Mm). En el siguiente paso se incubó la membrana con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C, en el caso de los lisados de líneas celulares con anticuerpo Ang2 (*MAB 0983, R&D Systems, Minneapolis, MN*) a una concentración 1:250 y anticuerpo NS5a (Ref. 1825, *ViroStat, Portland, Maine*) a una concentración de 1:100; en los homogenados hepáticos se incubó las membranas con anticuerpo Ang1 (*C19, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA*) y Ang2 (*MAB 0983, R&D Systems, Minneapolis, MN*) diluidos en Tris Buffer Salino (TBS) 1:100 y 1:250 (v/v), respectivamente. Al día siguiente, después de tres lavados con TBS de 15 minutos cada uno, se incubó con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios usados fueron conejo anti-cabra-peroxidasa de rábano (HRP) para Ang1 (1:5000) y cabra anti-ratón-HRP para Ang2 y NS5A (1:5000) (*Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL*). A continuación, se realizaron tres lavados con TBS-Tween al 0.1% de 15 minutos cada uno. Por último, las bandas fueron detectadas mediante un kit de detección de quimioluminiscencia



(*Supersignal West Pico Chemiluminiscence Substrate. Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL*) y cuantificadas por densitometría usando el software IMAGE STATION 2000 MM (KODAK ID digital Science, New York, NY, USA). La proteína GAPDH (1:2500, *Sigma Aldrich, USA*) se utilizó como control interno de carga.

#### **4. ELISA**

Los ensayos de ELISA se utilizaron para la determinación cuantitativa de:

1. Las concentraciones intrahepáticas de Ang1 y Ang2 en los extractos de las muestras de tejido hepático procedentes de pacientes con HCC y sujetos control.
2. Las concentraciones séricas de Ang1 y Ang2 en los pacientes con HCC.
3. La concentración de Ang2 en los extractos proteicos procedentes de la línea Huh7 y de los replicones del VHC.

Esta técnica consiste, básicamente, en una reacción colorimétrica mediada por una reacción antígeno-anticuerpo entre la proteína que se quiere analizar y un anticuerpo específico frente a esa proteína. El procedimiento en todos los ensayos fue similar, tras la preparación de las muestras y de los estándares (Ang1 y Ang2 recombinante humano), según se especifica en el Kit (*Quantikine: R&D Systems, Minneapolis, MN*). Se dispensó 100  $\mu$ L de solución diluyente Assay Diluent y 50  $\mu$ L de cada muestra o estándares en los pocillos correspondientes de la placa y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, tras 4 lavados con solución de lavado,

se añadió 200 µL del conjugado de Ang1 o Ang2 (anticuerpo monoclonal contra Ang1 o Ang2 conjugado con peroxidasa de rábano picante) y se volvió a incubar de nuevo a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación. Tras volver a lavar, se añadió una solución substrato desarrollándose color en forma proporcional a la cantidad de Ang1 o Ang2 que haya quedado fijada en el pocillo en el primer paso. Por último, la placa se envolvió en plástico y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, la reacción colorimétrica fue detenida y la intensidad del color se midió con la ayuda de un lector de densidad óptica a 450nm. Las concentraciones de Ang1 y Ang2 se determinaron comparando la densidad óptica de las muestras con la curva estándar. Todas las mediciones de las muestras se realizaron siempre por duplicado. El límite de detección de Ang1 y Ang2 era de 3.45 pg/mL y 8.29 pg/mL respectivamente, según las instrucciones del fabricante (*Quantikine: R&D Systems, Minneapolis, MN*).

## **5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables clínicas, bioquímicas y demográficas fueron expresadas como mediana y percentiles 25-75%, excepto para edad (mediana y rango). Los intervalos de confianza fueron calculados al 95%. Asimismo, los datos obtenidos de Ang1 y Ang2 se expresaron como mediana e intervalo de confianza (IC).

### **5.1 Diferencias de la expresión intrahepática de angiopoyetinas en pacientes con HCC y sujetos control**

Los distintos grupos de pacientes con HCC, clasificados según su grado de inflamación y estadio de fibrosis, así como en relación al grupo control, se analizaron mediante el *test* no paramétrico U de *Mann-Whitney*. Asimismo, se calculó la correlación entre la concentración de angiopoyetinas y la progresión de la FH y el grado de actividad inflamatoria mediante el *test* de Pearson. Los valores de  $p < 0.05$  bilateral fueron considerados significativos. Los datos fueron analizados con programa estadístico SPSS, versión 15.0 (*SPSS Inc, Chicago, IL*).

### **5.2 Análisis de variables relacionadas con la progresión de la HCC**

#### **Grupo de Estudio**

En una primera etapa se analizaron los datos de 108 pacientes con HCC para determinar la asociación entre los niveles séricos de angiopoyetinas con el estadio de fibrosis. Asimismo, se evaluó la capacidad discriminativa de las angiopoyetinas para diferenciar los siguientes estadios de fibrosis: fibrosis significativa ( $F > 1$ ), fibrosis moderada ( $F > 2$ ) y fibrosis grave ( $F > 3$ ), mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC-ROC) que nos sirve para cuantificar la capacidad de una prueba diagnóstica para discriminar entre los distintos estadios considerados. Además, para definir los resultados positivos y negativos de nuestro test, se seleccionó en la curva ROC un punto de corte

(índice de *Youden*) que corresponde al punto de la curva ROC donde la suma de los valores de sensibilidad y especificidad es mayor<sup>228</sup>. Asociados a este punto de corte, se calcularon los parámetros de valoración de la prueba diagnóstica, tales como: sensibilidad (capacidad de una prueba para detectar a un sujeto enfermo), especificidad (capacidad de una prueba para detectar correctamente individuos sanos), valor predictivo positivo (VPP: capacidad de la prueba de predecir si un individuo que ha sacado positivo en la prueba va a estar realmente enfermo), valor predictivo negativo (VPN: capacidad de la prueba de predecir si un individuo que ha sacado negativo en la prueba va a estar realmente sano). La sensibilidad es análoga a la potencia estadística de un estudio y si ésta aumenta también lo hace el VPN y disminuye la tasa de falsos negativos (probabilidad complementaria a la sensibilidad). Por su parte, la especificidad tiene la capacidad de confirmar la enfermedad, cuando ésta aumenta también lo hace el VPP y por lo tanto disminuye la tasa de falsos positivos. También, se determinaron el valor de la razón de probabilidad positiva (RPP: cociente entre la sensibilidad y la tasa de falsos positivos) y negativa (RPN: cociente entre la tasa de falsos negativos y la especificidad); ambos cocientes presentan la ventaja frente a VPP Y VPN de no depender de la proporción de la muestra sino tan sólo de la sensibilidad y especificidad de ésta. Un cociente con un valor de 1 indicaría que la prueba no tiene capacidad diagnóstica. Por último, se calculó el valor correspondiente a la exactitud o precisión de la prueba diagnóstica (PPD) que representa el grado de correlación de las medidas obtenidas mediante el test con las obtenidas a través del estándar de referencia (BH en nuestro caso).

Asimismo, se realizó una regresión logística simple (análisis univariante) con las principales variables clínicas y demográficas estudiadas. Los factores significativamente relacionados con la FH ( $p < 0.05$ ) fueron posteriormente sometidos a una regresión logística multivariante de pasos hacia atrás que elimina progresiva y automática aquellas variables no significativas del modelo. Las variables significativas en el análisis combinado se utilizaron para construir un nuevo índice de FH que se denominó AngioScore (AS). Además, se evaluó la capacidad discriminativa de AS mediante el cálculo de las curvas ROC, utilizándose los mismos parámetros estadísticos anteriormente descritos (AUC-ROC, sensibilidad, especificidad, etc.).

### **Validación del estudio**

En una segunda etapa se seleccionó otra población independiente de pacientes con HCC ( $n = 71$ ) para replicar y confirmar los resultados obtenidos en el Grupo de Estudio. Para ello, se evaluó la capacidad discriminativa de las angiopoyetinas, del resto de variables y AS para diferenciar los estadios de fibrosis ( $F > 1$ ,  $F > 2$ ,  $F > 3$ ) aplicando las mismas pruebas estadísticas previamente descritas (AUC-ROC, sensibilidad, especificidad, etc.)

### **Comparación de AS con otros índices de FH**

En una tercera etapa, se comparó AS con otros índices no invasivos de FH descritos para el diagnóstico de FH en el conjunto de pacientes estudiados. La comparación estadística entre los distintos modelos descritos para el diagnóstico de fibrosis y el nuevo índice obtenido, AS, se realizó con el Test de

*Long*, utilizándose el *MedCalc® software*. Los valores de  $p < 0.05$  bilateral fueron considerados significativos. Los datos fueron analizados mediante el uso del programa *MedCalc® software version 11.6.1.0*. Los índices utilizados para compararlos con AS, se describen a continuación:

**APRI:**  $100 \times (\text{AST (IU/L)/40}) / \text{Plaquetas (10}^9\text{/L)}$ <sup>205</sup>.

**FIB4:**  $\text{Edad (años)} \times \text{AST (IU/L)} / \text{Plaquetas (10}^9\text{/L)} \times \text{ALT (IU/L)}^{1/2}$ <sup>229</sup>.

**KING:**  $\text{Edad (años)} \times \text{AST (IU/L)} \times \text{INR} / \text{Plaquetas (10}^9\text{/L)}$ <sup>230</sup>.

**AAR:**  $\text{AST (IU/L)} / \text{ALT (IU/L)}$ <sup>231</sup>.

**GUCl:**  $(\text{AST} \times \text{INR} \times 100) / \text{Plaquetas (10}^9\text{/L)}$ <sup>232</sup>.

**LOK:**  $-5.56 - (0.0089 \times \text{Plaquetas (10}^9\text{/L)}) + (1.26 \times \text{AST (IU/L)} / \text{ALT (IU/L)} + 5.27 \times \text{INR})$ <sup>233</sup>.

**Forns:**  $7.811 - (3.131 \times \text{Ln Plaquetas (10}^9\text{/L)}) + (0.781 \times \text{Ln GGT (IU/L)}) + (3.467 \times \text{Ln Edad (años)} - 0.014 \times \text{Colesterol (g/dL)})$ <sup>210</sup>.

**FI:**  $8.0 - 0.01 \times \text{Plaquetas (10}^9\text{/L)} - \text{Albúmina (g/dL)}$ <sup>234</sup>.

**FCI:**  $(\text{FA (IU/L)} \times \text{Bilirrubina (g/dL)}) / (\text{Albúmina (g/dL)} \times \text{Plaquetas (10}^9\text{/L)})$ <sup>235</sup>.

Finalmente, se analizó la capacidad discriminativa de AS y de los otros índices calculados para diferenciar entre los siguientes estadios de fibrosis ( $F > 1$ ,  $F > 2$  y  $F > 3$ ) mediante el cálculo de las áreas bajo la curva (AUC-ROC) y el índice de *Youden*. Además, se seleccionaron en la curva ROC otros puntos de corte con relevancia diagnóstica, un bajo punto de corte que corresponde a un valor de sensibilidad superior al 90% ( $> 90\%$ ) y un alto punto de corte que pertenece a un punto de la curva ROC con una especificidad mayor al 90% ( $> 90\%$ ). Por último, se calculó el punto de corte de la curva ROC correspondiente al criterio óptimo, para su cálculo se tiene en cuenta la proporción relativa de los distintos

estadios de FH de salud que se pretende discriminar con la prueba (prevalencia de la enfermedad en la población) y también los costes relativos de los falsos negativos como positivos, así como los beneficios de las clasificaciones correctas. Asociados a estos puntos de corte (índice de *Youden*, >90% de sensibilidad, >90% de especificidad y criterio óptimo) se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, RPP, RPN y PPD, con sus respectivos intervalos de confianza (IC) del 95%.

### **5.3 Estudio de la expresión de Ang2 en distintos replicones del VHC**

Las diferencias de expresión de Ang2 en los replicones del VHC y la línea celular Huh7, con y sin los inhibidores empleados, se determinaron mediante la prueba *U de Mann-Whitney*. Los valores de  $p < 0.05$  bilateral fueron considerados significativos. Los datos fueron analizados mediante el empleo del programa SPSS, versión 15.0 (*SPSS Inc, Chicago, IL*).

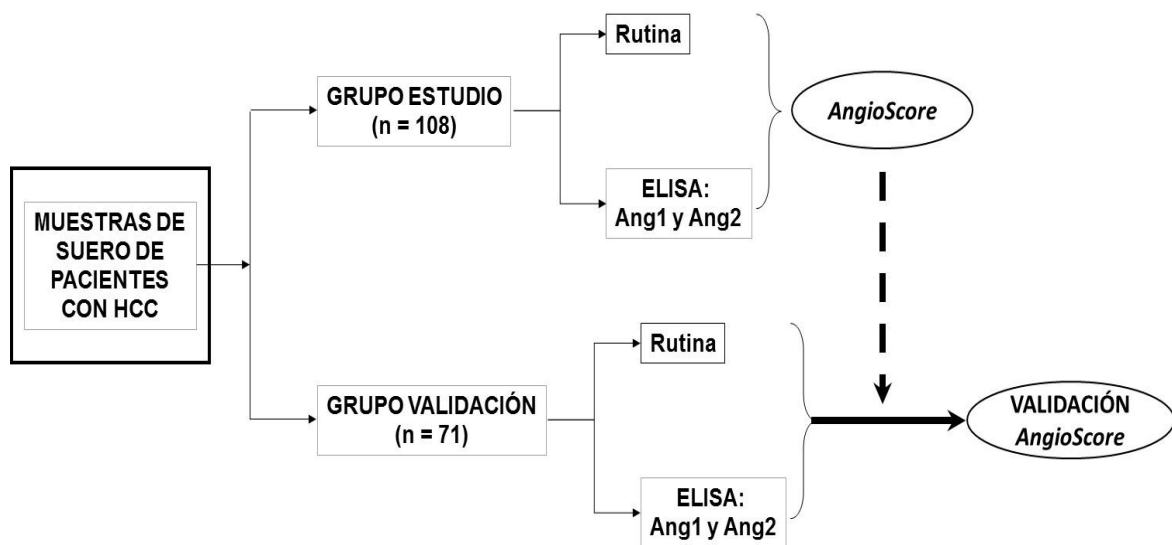
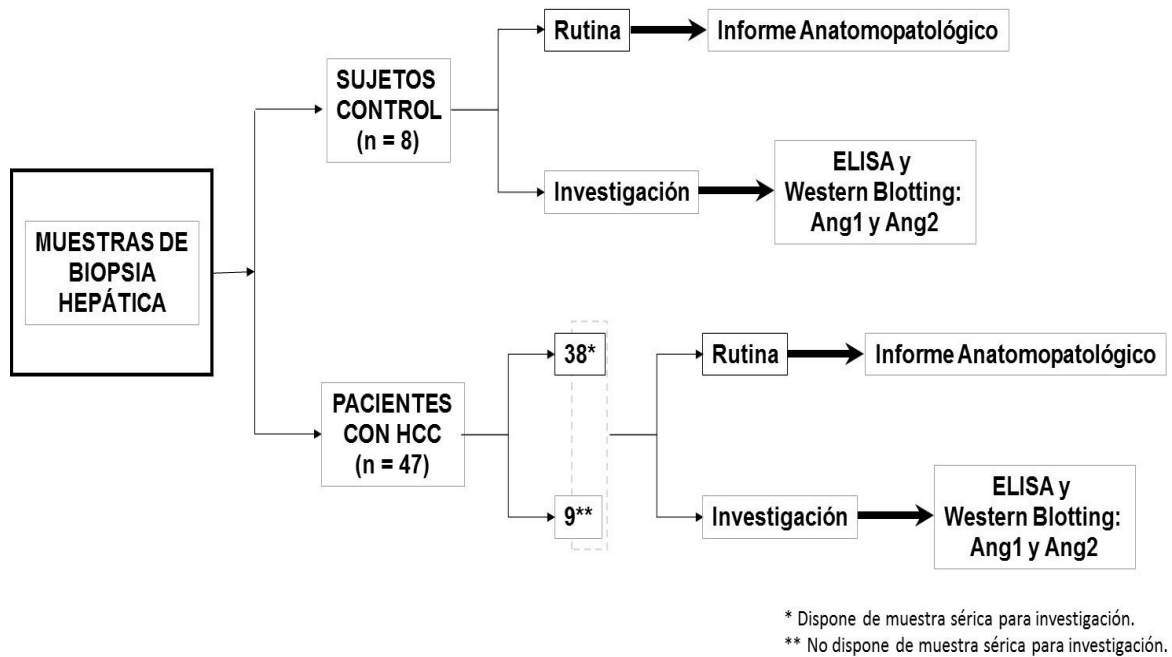


Figura 7. Esquema del Estudio de pacientes con HCC y controles sanos.



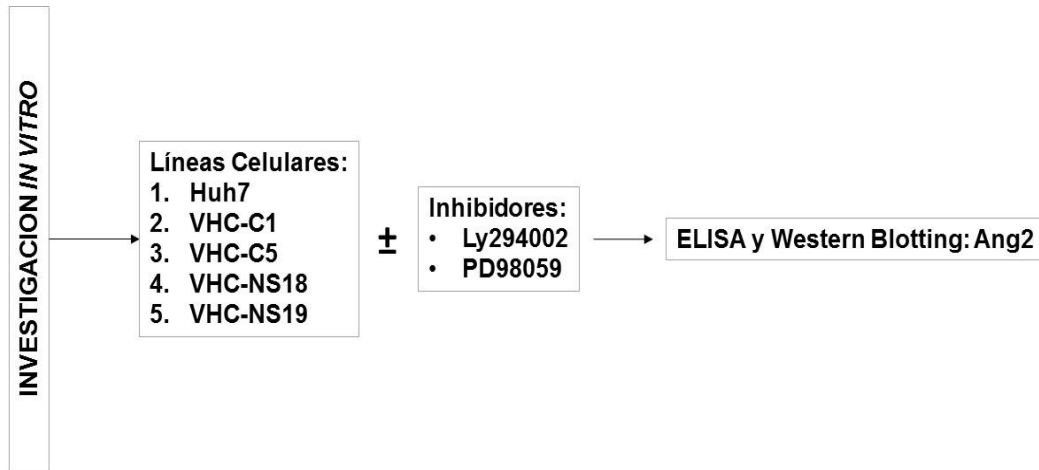


Figura 8. Esquema del Estudio de expresión de Ang2 en replicones del VHC.

---

---

## RESULTADOS

*“Para el investigador no existe alegría comparable a un descubrimiento,  
por pequeño que sea.”*

*Alexander Fleming (1881-1955).*

## V. RESULTADOS

### 1. EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES TISULARES DE ANGIOPOYETINAS EN BIOPSIAS HEPÁTICAS

La concentración intrahepática de Ang1, Ang2 y su cociente Ang2/Ang1 se analizó en biopsias hepáticas procedentes de 47 pacientes con HCC y 8 sujetos control.

Las características demográficas e histológicas de estos individuos se resumen en la **Tabla 1**. El 74% de los pacientes con HCC presentó un grado A2 de inflamación, mientras que dentro de los diferentes estadios de FH, el grupo de pacientes diagnosticados de cirrosis hepática (F4) fue el minoritario (8.5%). Sin embargo, uno de los pacientes no presentaba el grado de inflamación en su informe de BH de Anatomía Patológica según escala METAVIR, por lo que este paciente no pudo ser incluido en este análisis.

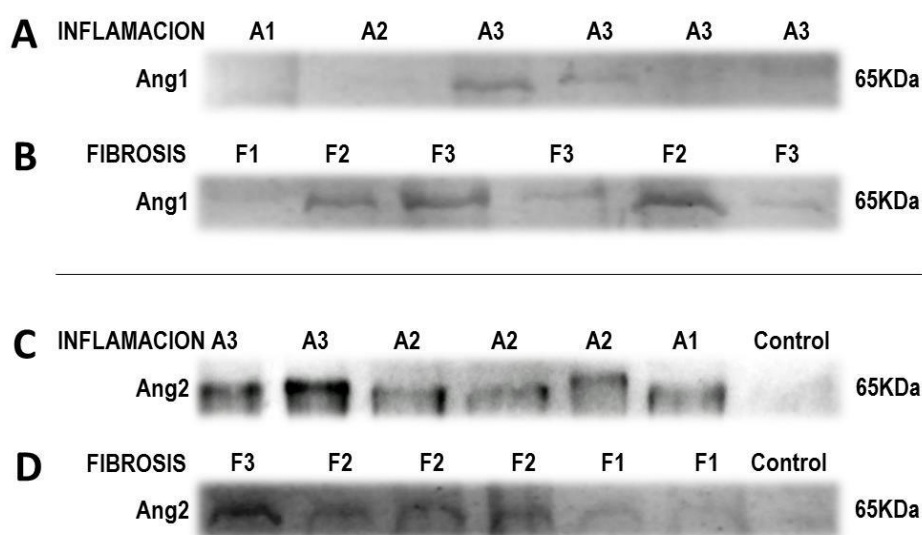
**Tabla 1. Variables demográficas-bioquímicas y clasificación histopatológica de sujetos control y de los pacientes con HCC incluidos en el estudio intrahepático**

VARIABLES	CONTROL (n = 8)	HCC (n = 47)
<b>Sexo, Masculino (%)</b>	4 (50)	28 (59.6)
<b>Edad (años)</b>	54 (25-76)	48 (25-65)
<b>Carga Viral (x10<sup>5</sup> IU/mL)</b>	NA	5.2 (1.5-8.3)
<b>Genotipo VHC, n (%)</b>		
1	NA	37 (78.7)
Non-1	NA	10 (21.3)
<b>Grado de Inflamación</b>	NA	
A1 n, (%)	NA	2 (4.3)
A2 n, (%)	NA	34 (72.3)
A3 n, (%)	NA	10 (21.3)
ND n, (%)	NA	1 (2.1)
<b>Estadio de Fibrosis</b>		
F1 n, (%)	NA	11 (23.4)
F2 n, (%)	NA	15 (31.9)
F3 n, (%)	NA	17 (36.2)
F4 n, (%)	NA	4 (8.5)

Los datos se muestran en número y porcentaje. A1 = actividad leve; A2 = actividad moderada; A3 = actividad grave; F1 = fibrosis periportal, sin septos; F2 = Fibrosis periportal, con pocos septos; F3 = numerosos septos, sin cirrosis; F4 = cirrosis. NA, no aplica; ND, no determinado.

Analizamos la expresión de Ang1 y Ang2 mediante la técnica de *Western Blotting* en los extractos proteicos obtenidos de las muestras de BH de pacientes con HCC y controles, según los distintos grados de inflamación y estadios de fibrosis.

La expresión de Ang1 no mostró diferencias entre los distintos grados de inflamación ni entre los diferentes estadios de fibrosis. Por el contrario, la expresión de Ang2 fue superior en los pacientes con HCC en relación a los controles. Además, los niveles de este factor proangiogénico se incrementaron de forma progresiva al aumentar el nivel de actividad necroinflamatoria o el estadio de fibrosis. La **Figura 9** muestra un experimento representativo en 6 pacientes y un control.



**Figura 9. Expresión de Ang1 y Ang2 en tejido hepático de pacientes con HCC en función del grado de actividad necroinflamatoria y estadio de FH.** La Figura 9 (A-D), muestra *Western Blotting* representativo de la expresión de Ang1 como de Ang2 en tejido hepático de pacientes con HCC. Las imágenes representan: (A) Expresión de Ang1 en pacientes con HCC clasificados por grado de inflamación; (B) Expresión de Ang1 en pacientes con HCC clasificados por estadio de fibrosis; (C) Expresión de Ang2 en pacientes con HCC y grupo control clasificados por grado de inflamación; (D) Expresión de Ang2 en pacientes con HCC agrupados y en grupo control clasificados por estadio de fibrosis.

En base a estos resultados, se analizó cuantitativamente la expresión intrahepática de angiopoyetinas Ang1 y Ang2 en los homogenados de todas las

biopsias hepáticas (47 de pacientes con HCC y 8 controles) mediante ensayos de ELISA. Se apreció una disminución de Ang1 en los pacientes con mayor grado de actividad necroinflamatorio [A1A2 (n=36) vs. (A3=10)] que fue significativo estadísticamente entre los pacientes con grado de inflamación grave (A3) y los sujetos control (**Figura 10A**).

En cambio, los niveles intrahepáticos de Ang2 en los pacientes con mayor grado de inflamación mostraron un incremento significativo respecto a los sujetos control que a su vez fue aumentando en función del índice de actividad necroinflamatoria (A1A2 vs. A3). Resultados similares se obtuvieron para el cociente Ang2/Ang1 (**Figura 10B y C**).

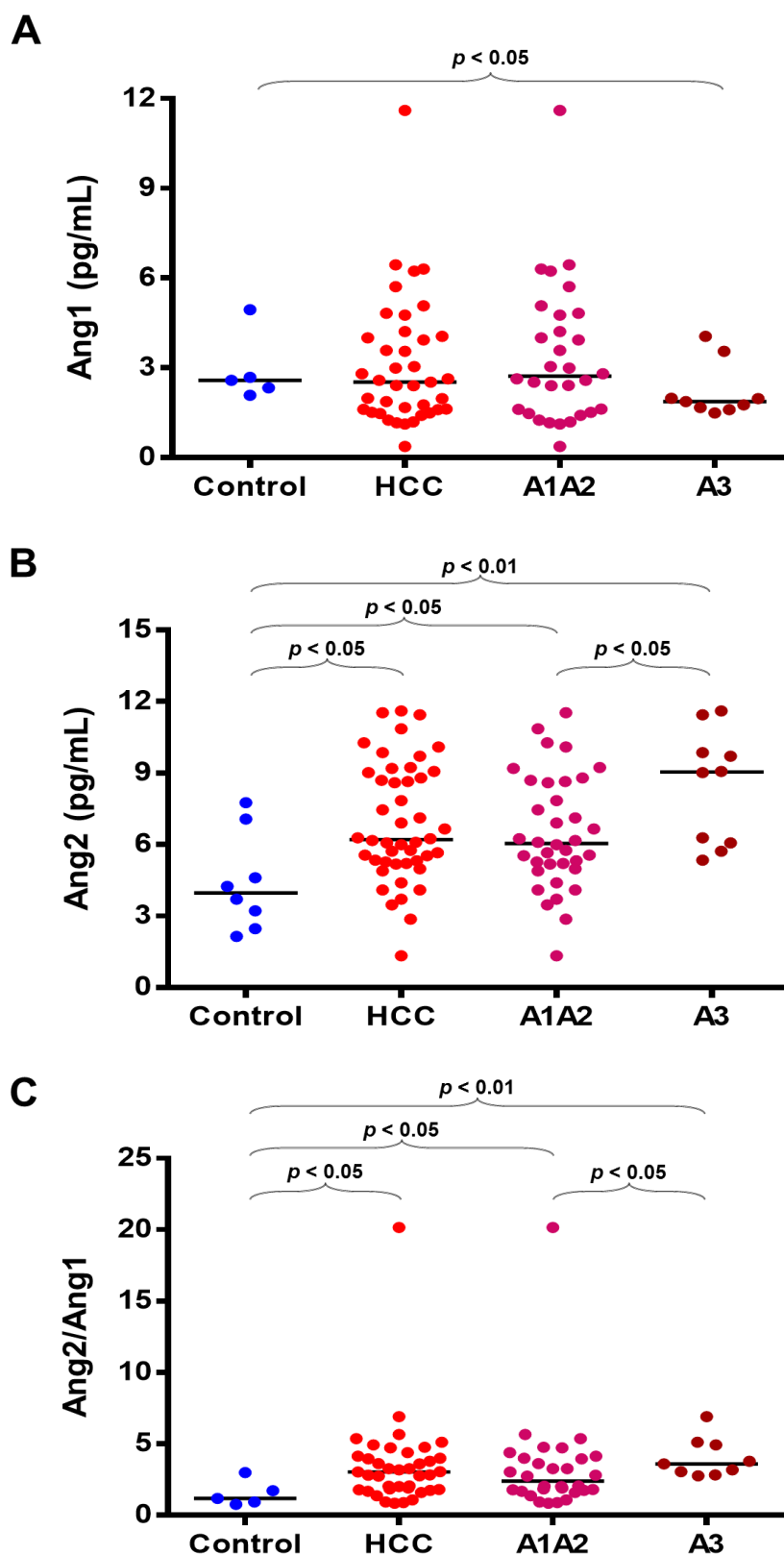


Figura 10. Comparación de las concentraciones de Ang1, Ang2 y cociente Ang2/Ang1 en tejido hepático en función del grado de inflamación en pacientes con HCC y en controles sanos.

Por otra parte, las concentraciones intrahepáticas de Ang1 no mostraban diferencias significativas en función del estadio de fibrosis (fibrosis moderada y fibrosis avanzada, F1F2 (n=26) vs. F3F4 (n=21), respectivamente); por el contrario, las concentraciones de Ang2 presentaban un incremento progresivo y significativo a mayor estadio de fibrosis hepática (F1F2 vs. F3F4), de forma equivalente al cociente Ang2/Ang1.

Asimismo, se observó un aumento significativo de las concentraciones intrahepáticas de Ang2 y el cociente Ang2/Ang1 en pacientes con fibrosis moderada (F1F2) y fibrosis avanzada (F3F4) respecto a los sujetos controles, mientras que no hubo diferencias significativas al comparar las concentraciones intrahepáticas de Ang1 de controles y pacientes con HCC (**Figura 11**).



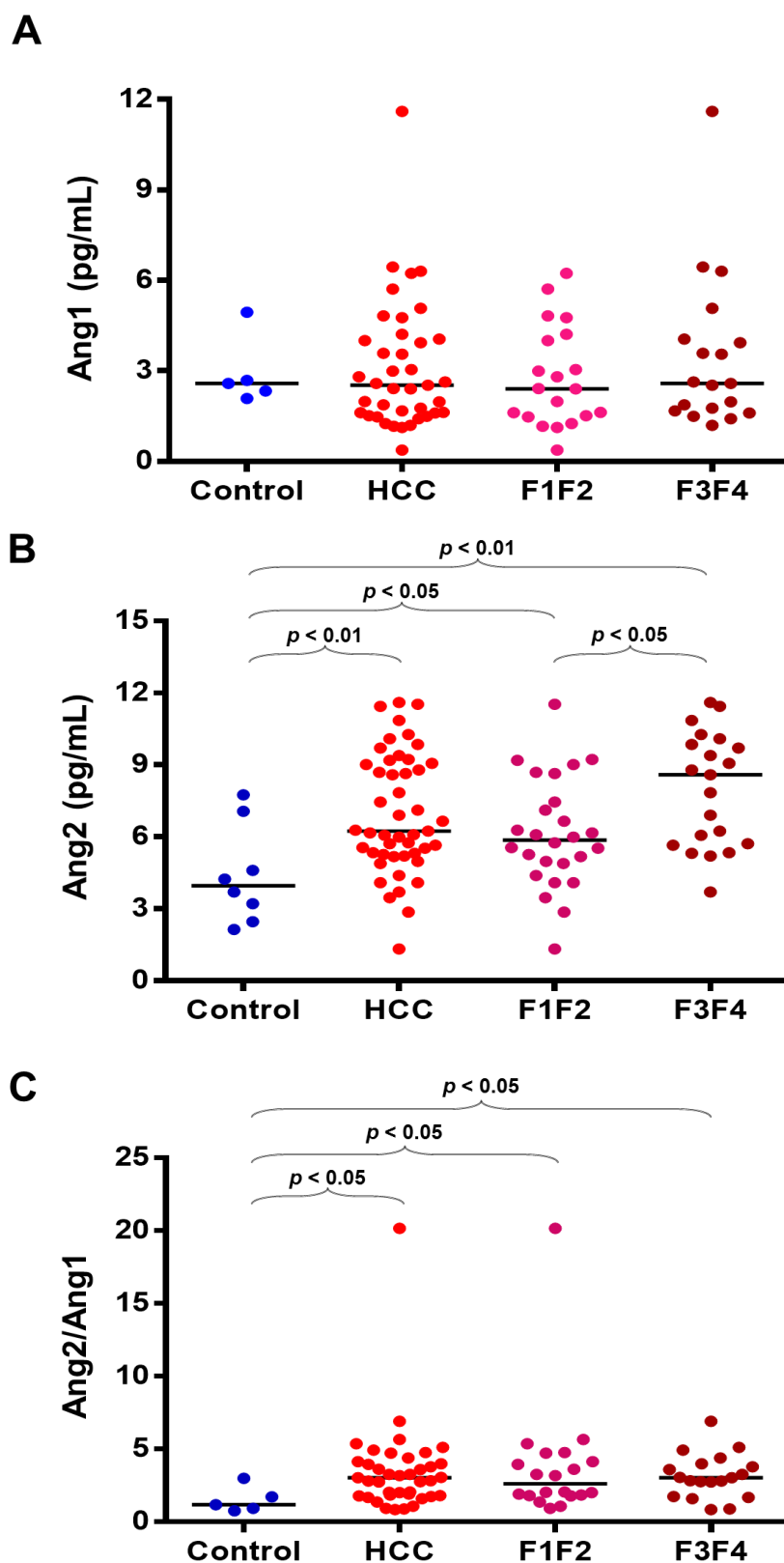


Figura 11. Comparación de las concentraciones de Ang1, Ang2 y cociente Ang2/Ang1 en tejido hepático en función del estadio de fibrosis en pacientes con HCC y en controles sanos.

La posible asociación entre las concentraciones intrahepáticas de las angiopoyetinas con el grado de inflamación y el estadio de fibrosis se analizó mediante el test de *Pearson* (**Tabla 2**). En este caso, la proteína Ang2 fue el único factor relacionado con actividad necroinflamatoria y FH.

**Tabla 2. Correlación entre las concentraciones de Ang1, Ang2 y cociente Ang2/Ang1 en 47 muestras de tejido hepático y la progresión de la HCC**

VARIABLES	n	Coeficiente Pearson	p
<b>GRADO DE INFLAMACION</b>			
Ang1	39	-0.122	0.46
<b>Ang2</b>	<b>46</b>	<b>0.376</b>	<b>0.01</b>
Cociente Ang2/Ang1	39	0.123	0.45
<b>ESTADIO DE FIBROSIS</b>			
Ang1	39	0.168	0.31
<b>Ang2</b>	<b>47</b>	<b>0.336</b>	<b>0.02</b>
Cociente Ang2/Ang1	39	0.0001	0.99

Ang1 = angiopoyetina 1; Ang2 = angiopoyetina 2 (R&D Systems®).

## **2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ANGIOPOYETINAS EN EL SUERO DE PACIENTES CON HCC**

### **2.1 Grupo de Estudio**

Las características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en el Grupo de Estudio se resumen en la **Tabla 3**. El sexo predominante fue el

masculino (66%) y la mediana de la edad 46 años. Asimismo, la mediana de la carga viral fue de 7.4 (3.0-13.0)  $\times 10^5$  IU/mL y el genotipo tipo 1 el mayoritario al estar presente en el 78% de los pacientes.

**Tabla 3. Variables demográficas y bioquímicas del Grupo de Estudio de pacientes con HCC**

VARIABLES	GRUPO DE ESTUDIO (n = 108)
Sexo Masculino (%)	71 (65.7)
Edad (años)	46 (25-65)
Carga Viral ( $\times 10^5$ IU/mL)	7.4 (3.0-13.0)
Genotipo VHC, n (%)	
1	84 (77.7)
No-1	24 (22.3)
AST (UI/L)	56.0 (39.0-91.8)
ALT (UI/L)	88.5 (64.3-128.8)
PA (UI/L)	123.5 (79.3-190.3)
GGT (UI/L)	48.5 (26.0-91.0)
Actividad Protrombina (%)	93.6 (85.5-101.0)
INR	1.0 (0.9-1.1)
Bilirrubina (mg/dL)	0.7 (0.5-0.9)
Plaquetas ( $\times 10^9$ /L) <sup>a</sup>	190.0 (151.0-224.0)
Colesterol Total (mg/dL) <sup>b</sup>	171.5 (153.7-189.0)
Albúmina (g/dL) <sup>c</sup>	4.3 (4.1-4.5)

Los datos se muestran en porcentaje o en mediana (percentiles 25-75), excepto para edad (mediana y rango). <sup>a</sup>n = 107; <sup>b</sup>n=106 y <sup>c</sup>n=101.

En la **Tabla 4** se describe la distribución histopatológica de estos pacientes. El grado A2 de inflamación fue el predominante (67.6%) aunque 13 de estos

pacientes no se clasificaron en función de su actividad necroinflamatoria debido a que no constaba en su informe de Anatomía Patológica. Los estadios de fibrosis predominantes fueron F2 y F3 y el 17% presentó un estadio avanzado de fibrosis (F4).

**Tabla 4. Clasificación histopatológica según la escala METAVIR del Grupo de Estudio de pacientes con HCC**

VARIABLES	GRUPO DE ESTUDIO (n = 108)
<b>GRADO DE INFLAMACION</b>	
A1 n, (%)	3 (2.8)
A2 n, (%)	73 (67.6)
A3 n, (%)	19 (17.6)
ND n, (%)	13 (12.0)
<b>ESTADIO DE FIBROSIS</b>	
F1 n, (%)	25 (23.3)
F2 n, (%)	31 (28.7)
F3 n, (%)	33 (30.5)
F4 n, (%)	19 (17.5)

Los datos se muestran en número y porcentaje. A1 = actividad leve; A2 = actividad moderada; A3 = actividad grave; F1 = fibrosis periportal, sin septos; F2 = Fibrosis periportal, con pocos septos; F3 = numerosos septos, sin cirrosis; F4 = cirrosis; ND = no determinado.

#### 2.1.1 Evaluación de las concentraciones séricas de angiopoyetinas

La determinación de los niveles en suero de angiopoyetinas en el Grupo de Estudio se expone en la **Tabla 5**. Las concentración (pg/mL) de Ang1 es mayor a la de Ang2 en una proporción ~14:1, situándose en el límite máximo de su

distribución habitual en suero en sujetos sanos (7:1 a 14:1) (*Quantikine: R&D Systems, Minneapolis, MN*).

**Tabla 5. Determinación de las concentraciones en suero de Ang1, Ang2 y cociente Ang2/Ang1 en el Grupo de Estudio de pacientes con HCC**

VARIABLES	GRUPO DE ESTUDIO (n = 108)
Ang1 (pg/mL)	54252.0 (47546.1-65850.0)
Ang2 (pg/mL)	3831.7 (3054.9-5125.8)
Cociente Ang2/Ang1	0.07 (0.05-0.011)

Los datos se muestran en mediana (I.C 95%). Ang1 = angiopoyetina 1; Ang2 = angiopoyetina 2 (R&D Systems®); Cociente Ang2/Ang1 = desequilibrio en las concentraciones séricas de angiopoyetinas (un elevado cociente refleja un efecto pro-inflamatorio).

Como muestra la **Figura 12**, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones en suero de Ang1, Ang2 ni el cociente Ang2/Ang1 entre el grupo de pacientes con grado de actividad necroinflamatoria leve-moderada (A1A2; n = 76) y en el grupo de enfermos con grado de inflamación grave (n = 19).

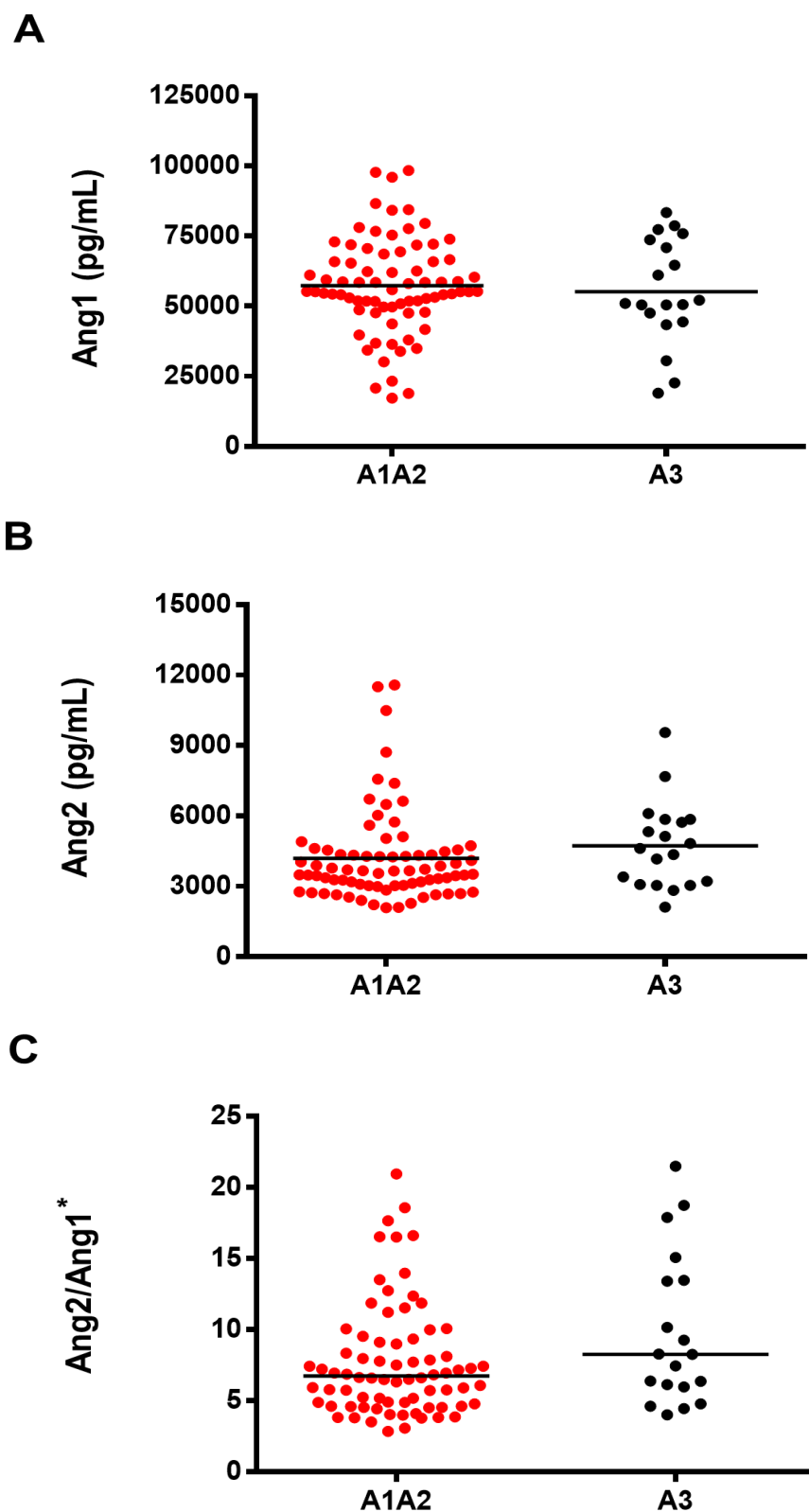


Figura 12. Concentración de angiopoietinas en el suero de los pacientes del Grupo de Estudio en función del grado de actividad necroinflamatoria.

\*Los datos de Ang2/Ang1 se muestran multiplicados por un factor de 100.

Asimismo, se analizaron las concentraciones de Ang1 y Ang2 según los distintos estadios de fibrosis en el Grupo de Estudio [F1 (n = 25); F2 (n = 31); F3 (n = 33); F4 (n = 19)] de pacientes con HCC como se muestra en la **Figura 13**. Se pudo observar que Ang1 disminuía de forma progresiva y significativa en relación al aumento de la FH. Por el contrario, las concentraciones séricas de Ang2 y el cociente Ang2/Ang1 mostraron un incremento progresivo y significativo a mayor estadio de fibrosis. Estas diferencias estadísticas fueron más notables al comparar los estadios de fibrosis leve vs. grave (F1 vs. F4), así como los estadios de fibrosis moderada vs. grave (F2 vs. F4).

Asimismo, Ang1 y el cociente Ang2/Ang1 mostraron diferencias significativas entre pacientes con un estadio F3 vs. F4 lo que indica su posible relevancia como biomarcadores de CH. Interesantemente, el valor del cociente Ang2/Ang1 también aumentó de forma significativa en pacientes con F3 frente a F2 lo que reflejaría su utilidad para detectar a pacientes con una fibrosis moderada. Por su parte, la concentración de Ang2 aumentó significativamente en pacientes con estadio de FH contiguos (F2 vs. F1) lo que podría ser valioso para discriminar a pacientes con fibrosis significativa.

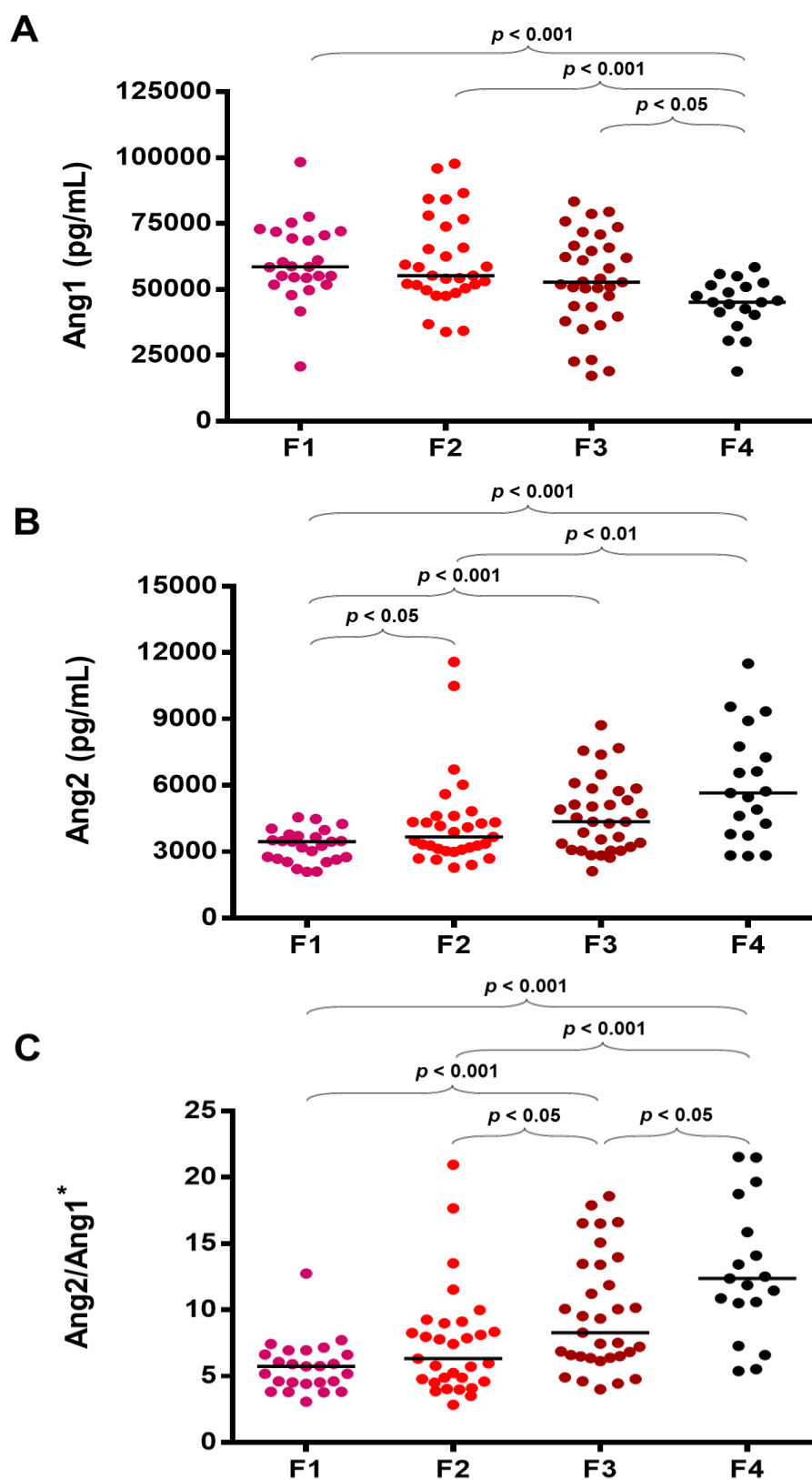


Figura 13. Concentración sérica de angiopoyetinas en función del estadio de fibrosis de los pacientes del Grupo de Estudio.

\*Los datos de Ang2/Ang1 se muestran multiplicados por un factor de 100.



Al analizar la correlación entre la actividad necroinflamatoria y la progresión de FH con las concentraciones séricas de las angiopoyetinas en el Grupo de Estudio se observó que existe una correlación negativa y significativa entre el grado de inflamación y el estadio de FH con los niveles en suero de Ang1. Por otra parte, existió una correlación positiva y significativa del grado de inflamación con los niveles de periféricos de Ang2 y cociente Ang2/Ang1, así como entre el estadio de FH con Ang2 y el cociente Ang2/Ang1. En cambio, no se observó asociación significativa entre el grado de inflamación y el cociente Ang2/Ang1. Estas correlaciones se presentan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6. Correlación entre las concentraciones séricas de Ang1, Ang2 y cociente Ang2/Ang1 respecto a la actividad inflamatoria y estadio de fibrosis en el Grupo de Estudio de pacientes con HCC**

VARIABLES	Coeficiente <i>Pearson</i>	<i>p</i>
<b>GRADO DE INFLAMACIÓN (n = 95)</b>		
Ang1	-0.208	0.04
Ang2	0.217	0.04
Cociente Ang2/Ang1	0.186	0.07
<b>ESTADIO DE FIBROSIS (n = 108)</b>		
Ang1	-0.313	0.001
Ang2	0.422	5.49 x 10 <sup>-6</sup>
Cociente Ang2/Ang1	0.417	7.24 x 10 <sup>-6</sup>

Ang1 = angiopoyetina 1; Ang2 = angiopoyetina 2.

### 2.1.2 Valor diagnóstico de las angiopoyetinas

La precisión de las concentraciones en suero de Ang1, Ang2 y del cociente Ang2/Ang1 para diferenciar a cada estadio de FH se evaluó mediante la construcción de curvas de rendimiento diagnóstico (ROC) y la determinación del *índice de Youden* (sensibilidad y especificidad más alta conjuntamente). El valor del área bajo la curva (AUC-ROC) de Ang1, Ang2 y del cociente Ang2/Ang1 en la predicción de fibrosis significativa ( $F>1$ ), fibrosis moderada ( $F>2$ ) y fibrosis grave ( $F>3$ ) fue elevado en la mayoría de los casos, con valores que oscilaron entre 0.639 a 0.804. Las AUC-ROC correspondientes se muestran en la **Figura 14**. De este modo, Ang1 mostró una importante capacidad de discriminar a pacientes con  $F>3$  (0.779). Por su parte, Ang2 presentó una alta capacidad diagnóstica para detectar todos los estadios de FH, con valores superiores a 0.7 al igual que el cociente Ang2/Ang1 que alcanzó un valor de AUC-ROC de 0.804 para detectar a pacientes con CH.

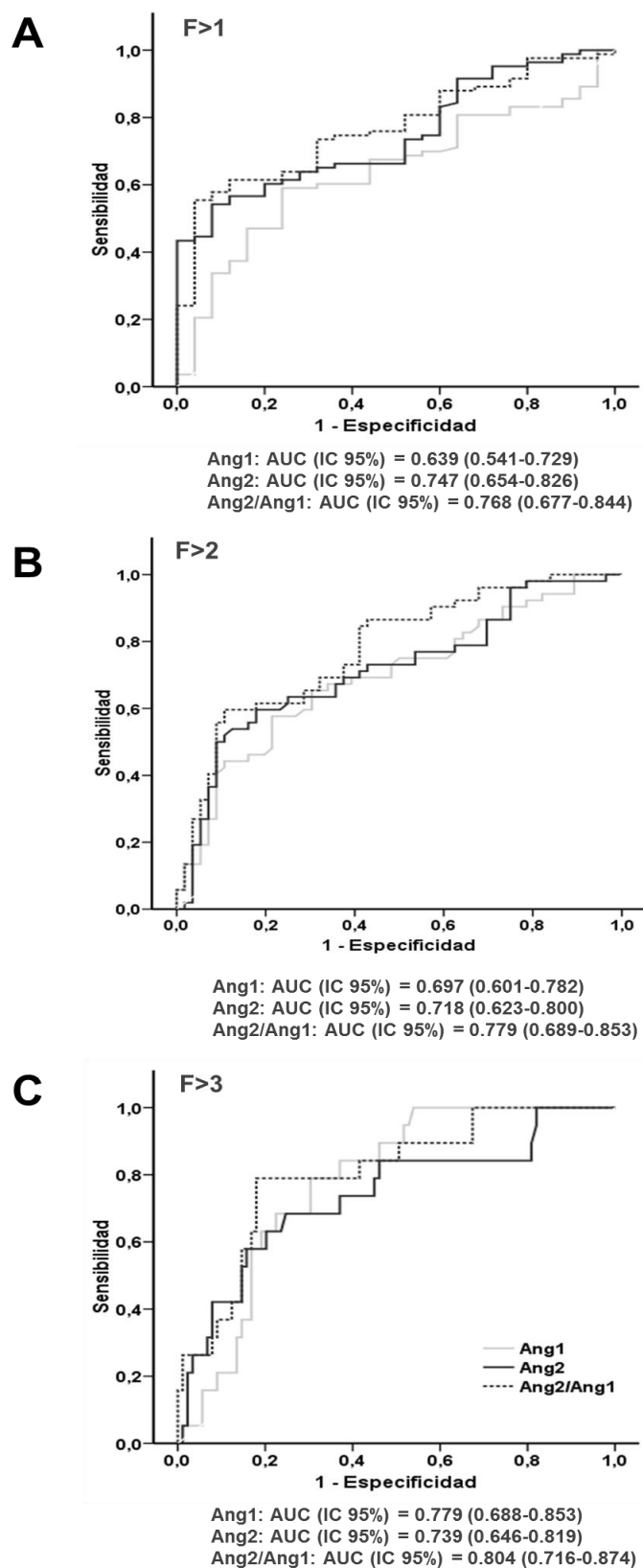


Figura 14. Análisis de la precisión de Ang1, Ang2 y cociente Ang2/Ang1 para el diagnóstico de los distintos estadios de fibrosis ( $F > 1$ ,  $F > 2$ ,  $F > 3$ ) del Grupo de Estudio.

La **Tabla 7** muestra el valor diagnóstico de las angiopoyetinas y su cociente para los diferentes estadios de fibrosis en el Grupo de Estudio. Por un lado, se observa que Ang1 presenta una mayor sensibilidad y Ang2 una mayor especificidad para detectar el estadio  $F>1$ . Por otro lado, tanto la Ang2 como el cociente Ang2/Ang1 presentan la mayor sensibilidad y especificidad para detectar los estadios  $F>2$  y  $F>3$ . Además, la Ang2 y el cociente muestran la mayor razón de probabilidad positiva (RPP), lo que indica una probabilidad incrementada para detectar los distintos estadios de FH. Interesantemente, el cociente Ang2/Ang1 mostró una mejor exactitud diagnóstica respecto a Ang1 y Ang2 para discriminar a cada uno de los estadios de fibrosis, con un valor de PPD de 64.5%,  $F>1$ ; 75.0%,  $F>2$  y 81.5%,  $F>3$ .

**Tabla 7. Valor diagnóstico de angiopoyetinas para los diferentes estadios de fibrosis en el Grupo de Estudio**

	I. Youden	Sensibilidad	Especificidad	RPP	RPN	VPP	VPN	PPD
<b>F&gt;1</b>								
<b>Ang1</b>	$\leq 54337.63$	59.04	76.00	2.46	0.54	89.1	35.8	62.9
<b>Ang2</b>	$> 4256.00$	54.22	92.00	6.78	0.50	95.7	37.7	62.8
<b>Ang2/Ang1</b>	$> 0.08$	55.42	96.00	13.86	0.46	97.9	39.3	64.5
<b>F&gt;2</b>								
<b>Ang1</b>	$\leq 51597.62$	57.69	78.57	2.69	0.54	71.4	66.7	68.5
<b>Ang2</b>	$> 4341.66$	59.62	82.14	3.34	0.49	75.6	68.7	71.3
<b>Ang2/Ang1</b>	$> 0.09$	59.62	89.29	5.56	0.45	83.8	70.4	75.0

Tabla 7. Cont.

F>3								
Ang1	≤51597.62	78.95	69.66	2.60	0.30	35.7	93.9	71.2
Ang2	>4616.67	68.42	75.28	2.77	0.42	37.1	91.8	74.1
Ang2/Ang1	>0.10	78.95	82.02	4.39	0.26	48.4	94.8	81.5

RPP = Razón de Probabilidad Positiva; RPN = Razón de Probabilidad Negativa; VPP = Valor Predictivo Positivo; VPN = Valor Predictivo Negativo; PPD = Precisión de la Prueba Diagnóstica; F>1 fibrosis significativa; F>2 fibrosis moderada; F>3 fibrosis grave.

### 2.1.3 Análisis de la asociación de otras variables clínicas y demográficas con la FH

En el análisis de regresión univariante de las variables clínicas y demográficas en relación a la fibrosis; las variables: edad, AST, ALT, GGT, recuento de plaquetas, INR, albúmina y bilirrubina total se asociaron significativamente con la FH. Entre estas variables, las plaquetas y la albúmina, al igual que la proteína Ang1, se correlacionaron negativamente con la fibrosis, mientras que el resto de las variables, como Ang2 y el cociente Ang2/Ang1 presentaron una correlación positiva (**Tabla 8**).

### 2.1.4 Desarrollo del nuevo índice no invasivo de FH

Entre las variables estudiadas, aquéllas que se relacionaron de forma significativa con la fibrosis (excepto Ang2/Ang1, no incluida por ser función de Ang1 y Ang2) fueron sometidas a una regresión logística multivariante de pasos hacia atrás que permitió generar un modelo matemático de FH, denominado AS, formado por Ang2 ( $p = 0.022$ ), edad ( $p = 0.006$ ), plaquetas ( $p$

=  $2.58 \times 10^{-4}$ ), AST ( $p = 0.004$ ), GGT ( $p = 0.021$ ) e INR ( $p = 2.68 \times 10^{-5}$ ) como variables independientes de predicción de fibrosis. Por otro lado, las variables Ang1, ALT, albumina y bilirrubina no formaron parte del modelo ya que no mantuvieron el suficiente nivel estadístico en el análisis multivariante por lo que no se mantuvieron en el modelo matemático (**Tabla 8**).

Tabla 8. Asociación de angiopoyetinas y otras variables clínicas-demográficas con la fibrosis hepática en el Grupo de Estudio

REGRESIÓN UNIVARIANTE				REGRESIÓN MULTIVARIANTE		
Variable	Coeficiente $\beta$ estandarizado	Coeficiente B no estandarizado (IC 95%) <sup>a</sup>	<i>p</i>	Coeficiente $\beta$ estandarizado	Coeficiente B no estandarizado (IC 95%)	<i>p</i>
Ang1	-0.310	3.352 (2.711-3.994)	0.001	0.020	1.20x10 <sup>-6</sup> (-8.17x10 <sup>-6</sup> -1.05x10 <sup>-5</sup> )	0.800
Ang2	0.422	2.1x10 <sup>-4</sup> (1.2x10 <sup>-4</sup> -3.0x10 <sup>-4</sup> )	5.49x10 <sup>-6</sup>	0.167	8.14x10 <sup>-5</sup> (1.18x10 <sup>-5</sup> -1.51x10 <sup>-4</sup> )	0.022
Ang2/Ang1	0.417	0.062 (0.036-0.088)	7.24x10 <sup>-6</sup>	-	-	-
Edad	0.344	0.038 (0.018-0.057)	2.70x10 <sup>-4</sup>	0.190	0.021 (0.006-0.036)	0.006
AST	0.435	0.009 (0.005-0.013)	2.60x10 <sup>-6</sup>	0.240	0.006 (0.002-0.009)	0.004
ALT	0.321	0.004 (0.002-0.006)	0.001	-0.095	-0.001 (-0.005-0.003)	0.504
GGT	0.351	0.004 (0.002-0.006)	1.90x10 <sup>-4</sup>	0.184	0.002 (3.02x10 <sup>-4</sup> -0.004)	0.021
FA	0.130	0.002 (-0.001-0.004)	0.180	-	-	-
Plaquetas <sup>a</sup>	-0.518	-0.010 [-0.013-(-0.007)]	1.08x10 <sup>-8</sup>	-0.271	-0.005 [-0.008-(-0.002)]	2.58 x 10 <sup>-4</sup>
INR	0.452	4.916 (3.048-6.783)	9.06x10 <sup>-7</sup>	0.323	3.369 (1.855-4.882)	2.68 x 10 <sup>-5</sup>
Albúmina <sup>b</sup>	-0.205	-0.594 [-1.160-(-0.029)]	0.039	0.062	0.181 (-0.246-0.608)	0.402
Colesterol Total <sup>c</sup>	-0.109	-0.003 (-0.009-0.003)	0.268	-	-	-
Bilirrubina Total	0.205	0.651 (0.051-1.250)	0.034	0.021	0.065 (-0.384-0.513)	0.775

n = 108, excepto para <sup>a</sup>n=107, <sup>b</sup>n=101, <sup>c</sup>n=106. Variables significativas se muestran en negrita.

La fórmula matemática del modelo resultante se muestra a continuación:

$$AS = - 6.634 + (1.083 \times \text{LogAng2}) + (1.792 \times \text{LogEdad}) + (3.782 \times \text{LogINR}) + (1.052 \times \text{LogAST}) - (0.005 \times \text{plaquetas}) + (0.653 \times \text{LogGGT})$$

La capacidad predictiva de AS como posible índice no invasivo de FH se determinó a través del análisis de AUC-ROC. AS mostró un valores elevados de AUC-ROC, superiores a 0.9 para discriminar entre los diferentes estadios de fibrosis:  $F > 1$ , 0.940 (IC del 95%, 0.877-0.977);  $F > 2$ , 0.941 (IC del 95%, 0.878-0.977) y  $F > 3$ , 0.918 (IC del 95%, 0.849-0.962). Además, AS presentó una alta precisión diagnóstica (PPD) para cada uno de los estadios de FH. Particularmente, AS obtuvo una exactitud diagnóstica muy elevada para detectar a pacientes con fibrosis moderada ( $F > 2$ ), con un valor de PPD por encima de un 90%. Por otra parte, los valores de sensibilidad y especificidad asociados al índice de *Youden* fueron altos en cada estadio de FH, por encima del 78%. Interesantemente, el nuevo índice alcanzó un 100% de sensibilidad para la discriminación de pacientes con fibrosis grave ( $F > 3$ ), lo que indicaría que valores de AS superiores a 2.5823 identifican correctamente a los pacientes con cirrosis ( $F > 3$ ). Asimismo, AS mostró una buena capacidad para diferenciar a pacientes con fibrosis significativa ( $F > 1$ ) de pacientes que presentan fibrosis mínima ( $F \leq 1$ ), según refleja su elevada especificidad (96.0%) (Tabla 9).



**Tabla 9. Valor diagnóstico de AS para los diferentes estadios de fibrosis en el Grupo de Estudio de pacientes con HCC**

AngioScore								
AUC-ROC	I. Youden	Sensibilidad	Especificidad	RPP	RPN	VPP	VPN	PPP
<b>F&gt;1</b>								
0.940	>2.0354	82.93	96.00	20.73	0.18	95.0	85.9	89.7
<b>F&gt;2</b>								
0.941	>2.2568	88.24	91.07	9.88	0.13	77.6	95.7	90.3
<b>F&gt;3</b>								
0.918	>2.5823	100.00	78.41	4.63	0	38.7	100.0	81.0

RPP = Razón de Probabilidad Positiva; RPN = Razón de Probabilidad Negativa; VPP = Valor Predictivo Positivo; VPN = Valor Predictivo Negativo; PPP = Precisión de la Prueba Diagnóstica; F>1 fibrosis significativa; F>2 fibrosis moderada; F>3 fibrosis grave.

## 2.2 Grupo de Validación

Los resultados preliminares obtenidos en el Grupo de Estudio, fueron validados en una cohorte independiente de 71 pacientes con HCC. Las características demográficas y clínicas de este grupo de pacientes fueron similares a las del Grupo de Estudio. Nuevamente predominaba el sexo el masculino (62%), la mediana de la edad fue de 44 años y la carga viral de 5.4 (2.2-12.0)  $\times 10^5$  IU/mL (Tabla 10).

**Tabla 10. Variables demográficas y bioquímicas del Grupo de Validación de pacientes con HCC**

VARIABLES	GRUPO DE VALIDACION (n = 71)
Sexo, Masculino (%)	44 (62.0)
Edad (años)	44 (22-67)
Carga Viral (x10 <sup>5</sup> IU/mL)	5.4 (2.2-12.0)
Genotipo VHC, n (%)	
1	60 (85.5)
No-1	11 (15.5)
AST (UI/L)	46.0 (34.0-69.0)
ALT (UI/L)	69.0 (46.0-106.0)
PA (UI/L)	135.0 (73.0-178.0)
GGT (UI/L)	36.0 (20.0-72.0)
Actividad Protrombina (%)	90.1(81.0-102.3)
INR	1.0 (0.9-1.1)
Bilirrubina (mg/dL)	0.7 (0.5-0.9)
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L) <sup>a</sup>	197.0 (160.0-237.0)
Colesterol Total (mg/dL) <sup>b</sup>	165.0 (151.3-191.0)
Albúmina (g/dL) <sup>c</sup>	4.4 (4.2-4.5)

Los datos se muestran en porcentaje o en mediana (percentiles 25-75), excepto para edad (mediana y rango). <sup>a</sup>n = 71; <sup>b</sup>n=68 y <sup>c</sup>n=69.

La distribución histopatológica del Grupo de Validación se presenta en la **Tabla 11**. En este caso, en 11 pacientes no se dispuso el dato de actividad necroinflamatoria. En este grupo de pacientes, el grado predominante de actividad necroinflamatoria fue A2 y un 17% de pacientes presentaron un estadio de fibrosis F4.

**Tabla 11. Clasificación histopatológica según la escala METAVIR del Grupo de Validación de pacientes con HCC**

VARIABLES	GRUPO DE VALIDACION (n = 71)
<b>GRADO DE INFLAMACION</b>	
A1 n, (%)	2 (2.8)
A2 n, (%)	51 (71.8)
A3 n, (%)	7 (9.9)
ND n, (%)	11 (15.5)
<b>ESTADIO DE FIBROSIS</b>	
F1 n, (%)	17 (23.9)
F2 n, (%)	35 (49.6)
F3 n, (%)	7 (9.6)
F4 n, (%)	12 (16.9)

Los datos se muestran en número y porcentaje. A1 = actividad leve; A2 = actividad moderada; A3 = actividad grave; F1 = fibrosis periportal, sin septos; F2 = Fibrosis periportal, con pocos septos; F3 = numerosos septos, sin cirrosis; F4 = cirrosis. ND, no determinado.

### 2.2.1 Evaluación de las concentraciones séricas de angiopoyetinas

Los resultados obtenidos a partir de las determinaciones en suero de las angiopoyetinas en el grupo de Validación se exponen en la **Tabla 12**. Las concentraciones séricas tanto de Ang1 como de Ang2, así como el cociente Ang2/Ang1 no fueron diferentes entre los grupos de Estudio y de Validación, manteniendo la proporción Ang2:Ang1, 14:1 como se mencionó previamente.

**Tabla 12. Determinación de las concentraciones séricas de Ang1, Ang2, cociente Ang2/Ang1 en el Grupo de Validación de pacientes con HCC**

VARIABLES	GRUPO DE VALIDACION (n = 71)
Ang1 (pg/mL)	49752.1 (38243.6-65836.8)
Ang2 (pg/mL)	3417.2 (2836.8-4711.0)
Cociente Ang2/Ang1	0.07 (0.05-0.09)

Datos se muestran en mediana (I.C 95%). Ang1 = angiopoyetina 1; Ang2 = angiopoyetina 2; Cociente Ang2/Ang1 = desequilibrio en las concentraciones séricas de angiopoyetinas (un elevado cociente refleja un efecto pro-inflamatorio).

En el Grupo de Validación no se observaron diferencias en las concentraciones séricas de Ang1, Ang2 y ni en el cociente Ang2/Ang1 entre los pacientes con actividad necroinflamatoria leve-moderada (A1A2; n = 53) y grave (n = 7), hallazgos similares a los observados previamente en el Grupo de Estudio (**Figura 15**).

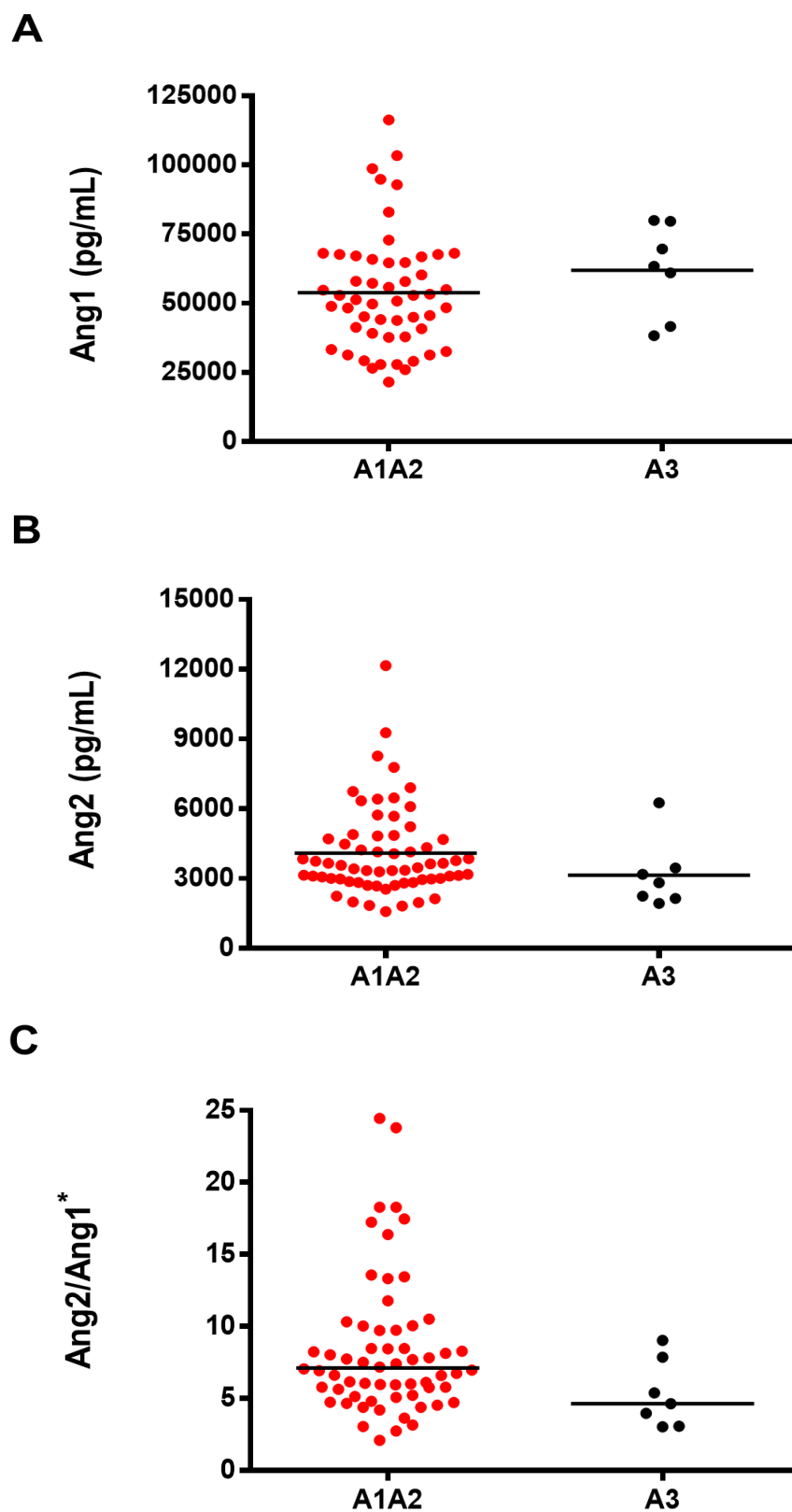


Figura 15. Asociación entre las concentraciones séricas de Ang1, Ang2, Cociente Ang2/Ang1 y grado de inflamación en el Grupo de Validación.

\*Los datos de Ang2/Ang1 se muestran multiplicados por un factor de 100.

Al analizar las concentraciones de Ang1 y Ang2 según los distintos estadios de fibrosis del Grupo de Validación [F1 (n = 17); F2 (n = 35); F3 (n = 7); F4 (n = 12)] (**Figura 16**), observamos que los niveles periféricos de Ang1, Ang2 y el cociente Ang2/Ang1 presentaron un comportamiento similar al Grupo de Estudio.

En ambos grupos de pacientes, Ang1 mostró una disminución progresiva y significativa asociada a la progresión de la FH a etapas más avanzadas; sin embargo, las concentraciones séricas de Ang2 y del cociente Ang2/Ang1, mostraron un incremento progresivo y significativo a mayor estadio de fibrosis. Nuevamente, las diferencias estadísticas son más evidentes al comparar los estadios de fibrosis leve vs. grave (F1 vs. F4), así como los estadios de fibrosis moderada vs. grave (F2 vs. F4).

Asimismo, se pudo comprobar que tanto Ang1, Ang2 como su cociente eran muy útiles como biomarcadores de CH (F>3), debido a que en todos los casos se observaron diferencias significativas entre pacientes con un estadio F4 respecto a F3.

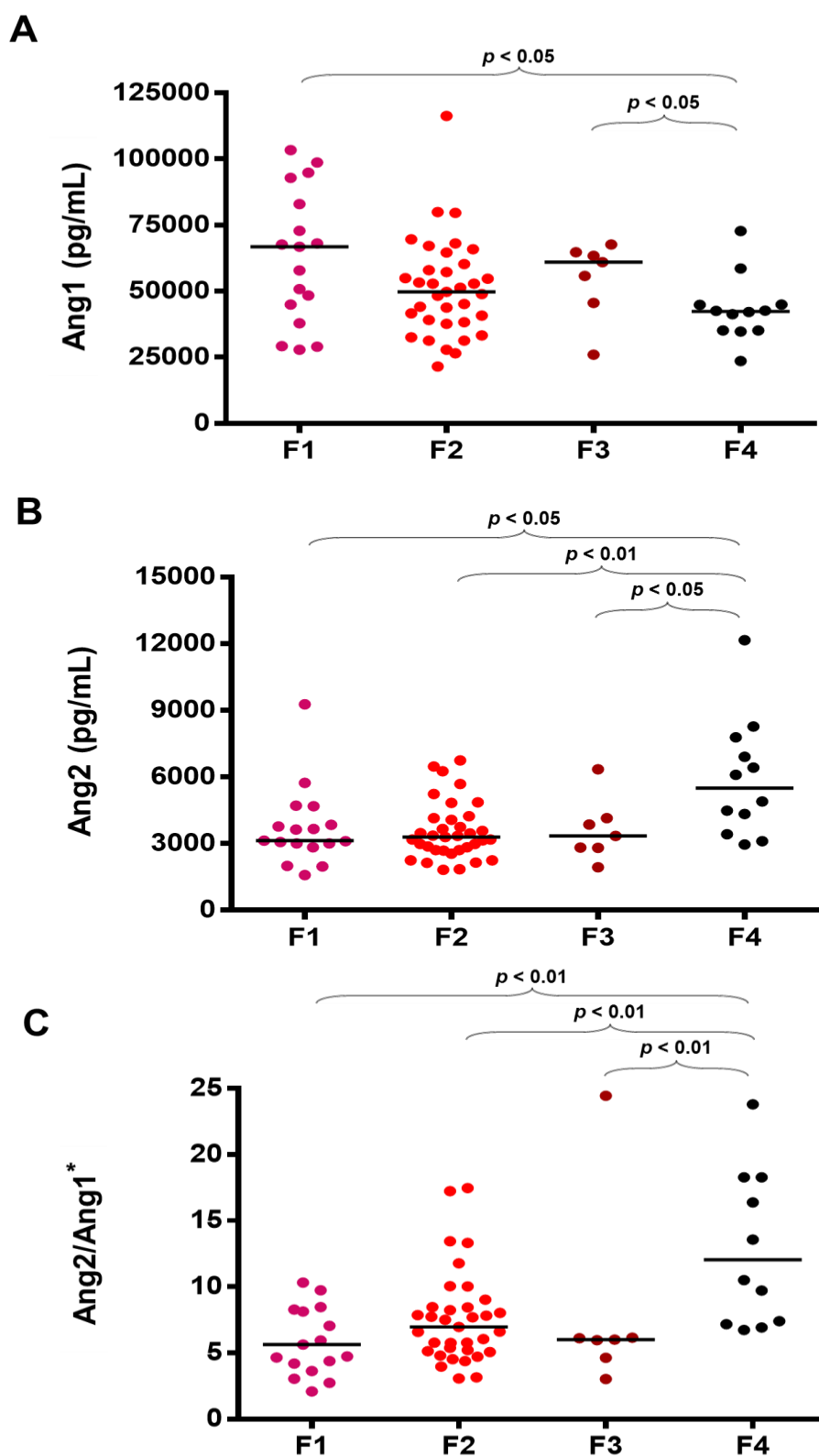


Figura 16. Asociación entre las concentraciones séricas de Ang1, Ang2, Cociente Ang2/Ang1 y estadio de fibrosis en el Grupo de Validación.

\*Los datos de Ang2/Ang1 se muestran multiplicados por un factor de 100.

Las correlaciones de *Pearson* se presentan en la **Tabla 13**. El Grupo de Validación mostró una correlación negativa entre el grado de inflamación y Ang1, así como entre el estadio de FH y Ang1, pero solo fue estadísticamente significativo para la FH. Asimismo, este grupo de pacientes mostró una correlación positiva y significativa entre el estadio de FH y Ang2, y entre el estadio de FH y el cociente Ang2/Ang1, respaldando los resultados obtenidos en el Grupo de Estudio.

**Tabla 13. Correlación entre las concentraciones séricas de Ang1, Ang2 y cociente Ang2/Ang1 respecto a la actividad inflamatoria y estadio de fibrosis en el Grupo de Validación de pacientes con HCC**

VARIABLES	Coeficiente <i>Pearson</i>	<i>P</i>
<b>GRADO DE INFLAMACION (n = 60)</b>		
Ang1	-0.090	0.49
Ang2	-0.072	0.58
Cociente Ang2/Ang1	-0.057	0.66
<b>ESTADIO DE FIBROSIS (n = 71)</b>		
Ang1	-0.287	0.01
Ang2	0.393	0.001
Cociente Ang2/Ang1	0.380	0.001

Ang1 = angiopoyetina 1; Ang2 = angiopoyetina 2.

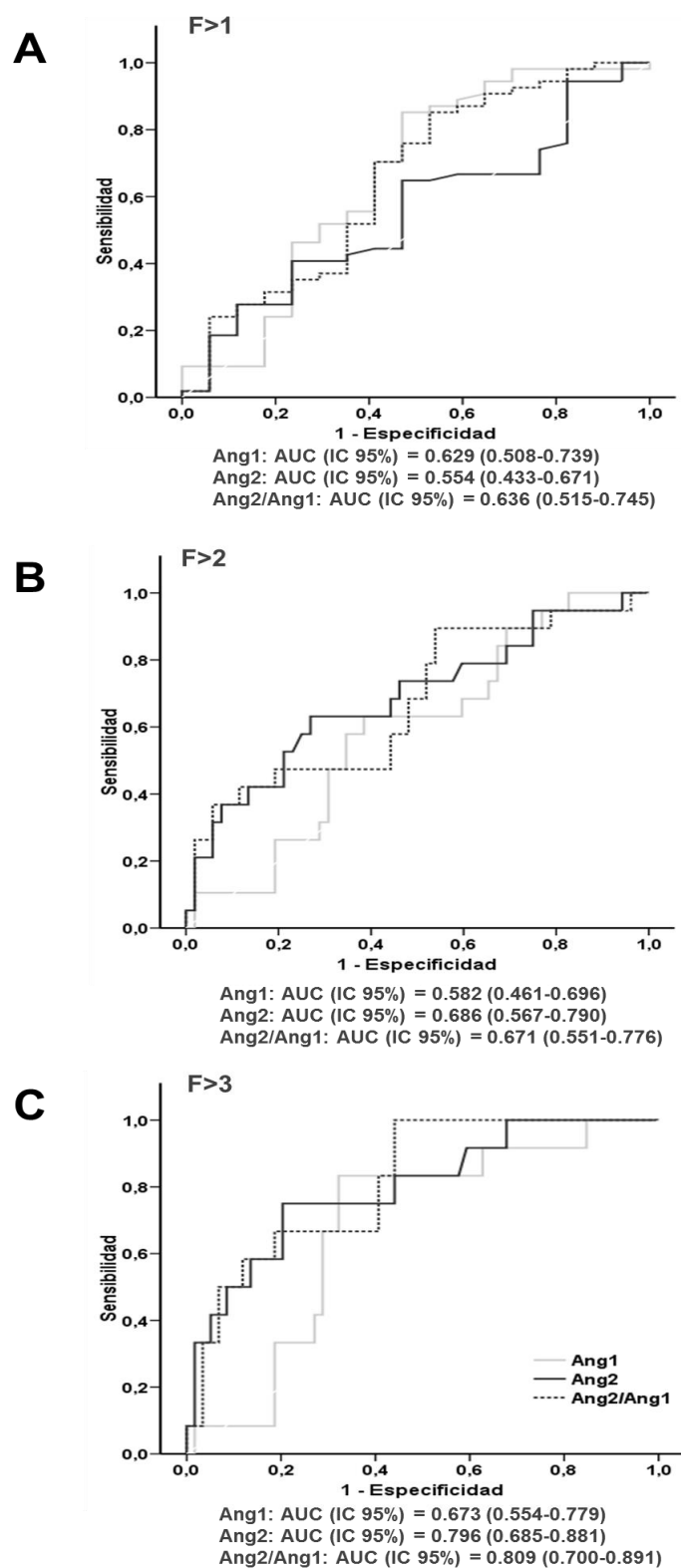


### 2.2.2 Valor diagnóstico de las angiopoyetinas

La capacidad de las angiopoyetinas y su cociente para discriminar cada uno de los estadios de fibrosis en el mencionado grupo de pacientes se muestra en la **Figura 17** y **Tabla 14**. Los resultados coinciden con los observados en el Grupo de Estudio, donde destaca la alta sensibilidad y especificidad de las angiopoyetinas para discriminar entre los distintos estadios de FH, particularmente Ang2.

Por otra parte, la precisión diagnóstica de las angiopoyetinas se mantuvo alta, especialmente la de Ang2 que presentó un valor de PPD superior al 78% para predecir fibrosis grave y unos valores aceptables (69.9%) para detectar pacientes con fibrosis moderada.

Interesantemente, el valor de especificidad más elevado para el diagnóstico de pacientes con  $F > 3$  correspondió a Ang2 (78.9% de especificidad) mientras que el cociente Ang2/Ang1 reflejó un 100% de sensibilidad, lo que nuevamente indica el gran potencial de estos factores proangiogénicos para diagnosticar eficazmente la CH ( $F > 3$ ).



**Figura 17. Análisis de la capacidad diagnóstica de Ang1, Ang2 y cociente Ang2/Ang1 para los distintos estadios de fibrosis (F>1, F>2, F>3) en el Grupo de Validación.**

**Tabla 14. Valor diagnóstico de angiopoyetinas para los diferentes estadios de fibrosis en el Grupo de Validación**

	<b>I. Youden</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>RPP</b>	<b>RPN</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>	<b>PPD</b>
<b>F&gt;1</b>								
<b>Ang1</b>	≤65836.75	85.19	47.37	1.62	0.31	82.1	52.9	75.4
<b>Ang2</b>	>3136.44	64.81	52.63	1.37	0.67	79.5	34.5	61.6
<b>Ang2/Ang1</b>	>0.05	85.19	47.37	1.62	0.31	82.1	52.9	75.4
<b>F&gt;2</b>								
<b>Ang1</b>	≤45532.38	63.16	61.11	1.62	0.60	36.4	82.5	61.6
<b>Ang2</b>	>3838.63	63.16	72.22	2.27	0.51	44.4	84.8	69.9
<b>Ang2/Ang1</b>	>0.06	89.47	43.30	1.67	0.23	37.0	92.6	57.5
<b>F&gt;3</b>								
<b>Ang1</b>	≤44937.38	83.33	67.21	2.54	0.25	33.3	95.3	69.8
<b>Ang2</b>	>4236.60	75.00	78.90	3.52	0.32	40.9	94.1	78.3
<b>Ang2/Ang1</b>	>0.07	100.00	55.74	2.26	0.00	30.8	100.0	63.0

RPP = Razón de Probabilidad Positiva; RPN = Razón de Probabilidad Negativa; VPP = Valor Predictivo Positivo; VPN = Valor Predictivo Negativo; PPD = Precisión de la Prueba Diagnóstica; F>1 fibrosis significativa; F>2 fibrosis moderada; F>3 fibrosis grave.

### 2.2.3 Validación de AS como nuevo índice no invasivo de FH

Los valores de AUC-ROC de AS fueron superiores a 0.7 en todos casos en el Grupo de Validación; en concreto, 0.753 (IC del 95%, 0.629-0.876) para F>1; 0.831 (IC del 95%, 0.705-0.957) para F>2 y 0.931 (IC del 95%, 0.842-1.019)

para  $F>3$ . La exactitud diagnóstica de AS se mostró muy elevada para discriminar a pacientes con  $F>2$ , por encima de un 90%; además, se mantuvo también alta para detectar a sujetos con una  $F>1$  (83.3%) y  $F>3$  (89.6%). Por tanto, AS también presentó una buena capacidad diagnóstica para caracterizar la progresión de la FH en este grupo de pacientes (**Tabla 15**).

**Tabla 15. Valor diagnóstico de AS para los diferentes estadios de fibrosis en el Grupo de Validación**

AngioScore								
AUC-ROC	I. Youden	Sensibilidad	Especificidad	RPP	RPN	VPP	VPN	PPD
<b>F&gt;1</b>								
0.753	>1.6075	90.74	76.47	3.86	0.12	78.1	89.9	83.3
<b>F&gt;2</b>								
0.831	>2.5207	84.21	92.31	10.95	0.17	79.4	94.3	90.2
<b>F&gt;3</b>								
0.931	>2.5524	100.00	88.14	8.43	0	53.5	100.0	89.6

RPP = Razón de Probabilidad Positiva; RPN = Razón de Probabilidad Negativa; VPP = Valor Predictivo Positivo; VPN = Valor Predictivo Negativo; PPD = Precisión de la Prueba Diagnóstica;  $F>1$  fibrosis significativa;  $F>2$  fibrosis moderada;  $F>3$  fibrosis grave.

Al comparar las curvas de los Grupos de Estudio y Validación, no se observaron diferencias significativas entre las diferentes curvas AUC-ROC obtenidas, excepto en el caso de discriminar a pacientes con fibrosis leve ( $p = 0.005$ ) donde resultó mejor el valor obtenido en el Grupo de Estudio (**Tabla 16**).

**Tabla 16. Comparación entre las AUC-ROC de la nueva prueba diagnóstica, AngioScore (AS) en los grupos de Estudio y Validación de pacientes con HCC**

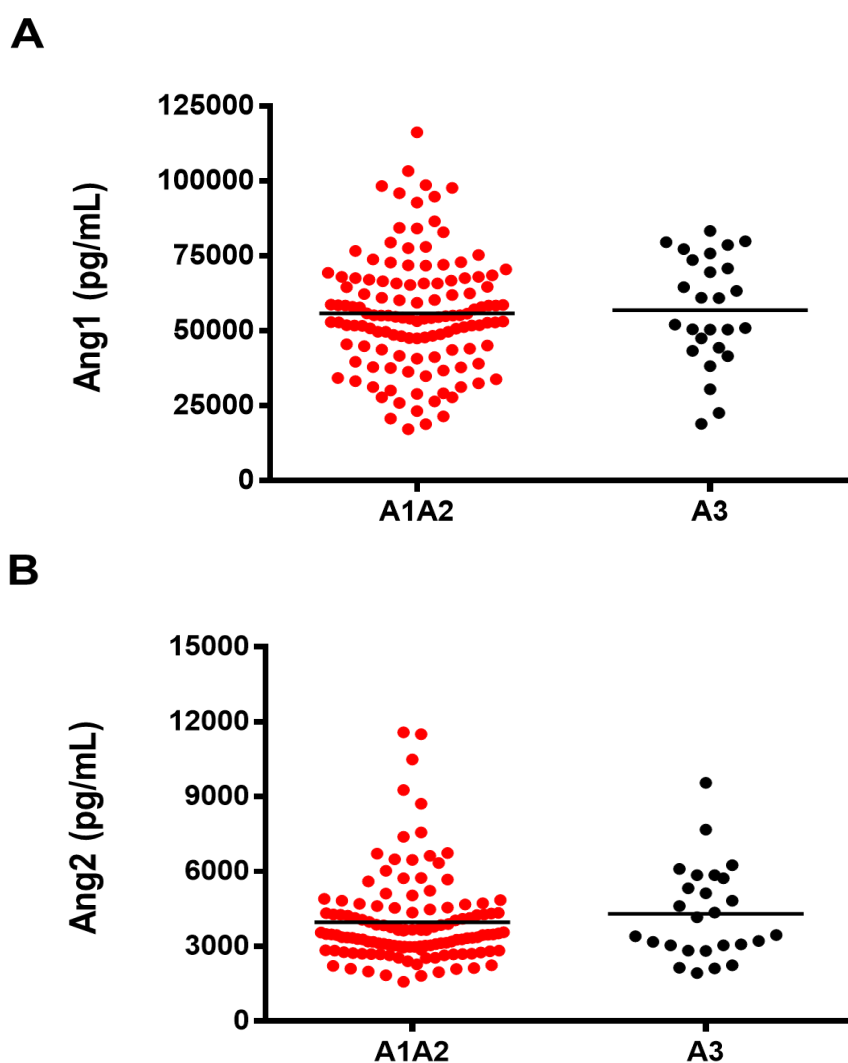
Grupos HCC	AUC-ROC	EEM	<i>p</i>
F>1			
Estudio	0.940 (0.877-0.977)	0.024	0.005
Validación	0.753 (0.629-0.879)	0.063	
F>2			
Estudio	0.941 (0.874-0.977)	0.022	0.1
Validación	0.831 (0.705-0.957)	0.064	
F>3			
Estudio	0.918 (0.849-0.962)	0.026	0.8
Validación	0.931 (0.842-1.019)	0.045	

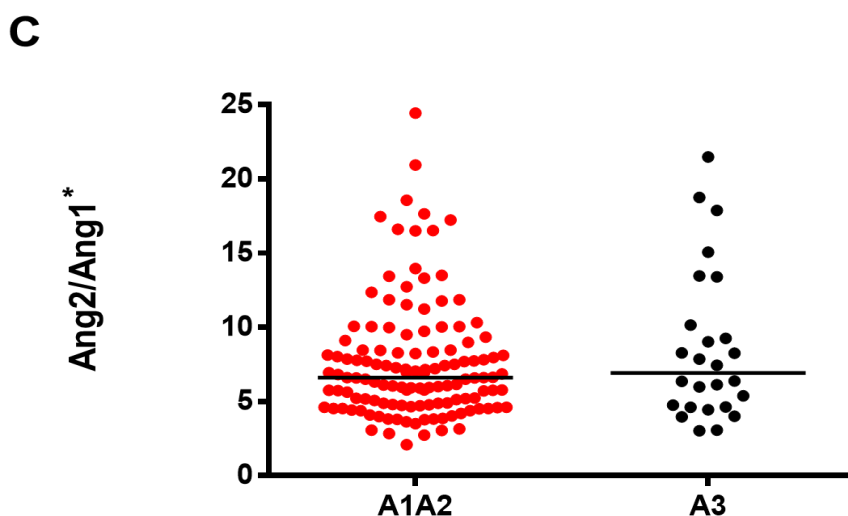
HCC: Hepatitis crónica C; AS = AngioScore; AUC = área bajo la curva; EEM = error estándar de la media; F>1 = fibrosis significativa; F>2 = fibrosis moderada; F>3 = fibrosis grave.

## 2.3 POBLACION TOTAL DE PACIENTES CON HCC

### 2.3.1 Evaluación de las concentraciones séricas de angiopoyetinas

De forma similar a lo observado anteriormente, al analizar los datos de todos los pacientes no se observaron diferencias en las concentraciones séricas de Ang1, Ang2, ni en el cociente Ang2/Ang1 entre pacientes con actividad necroinflamatoria leve-moderada (A1A2; n = 129) y grave (A3; n = 26), (**Figura 18**).





**Figura 18. Asociación entre las concentraciones séricas de Ang1, Ang2, cociente Ang2/Ang1 y grado de inflamación en el total de pacientes con HCC.**

\*Los datos de Ang2/Ang1 se muestran multiplicados por un factor de 100.

Las concentraciones de Ang1 presentaron una disminución progresiva y significativa según aumentaba el estadio de fibrosis; por el contrario, las concentraciones séricas de Ang2 y del cociente Ang2/Ang1, mostraron un incremento progresivo y significativo en relación al aumento de FH, como refleja la **Figura 19**. Estas diferencias alcanzan mayor significación estadística cuando se comparan los pacientes cirróticos (F4) con el resto de pacientes (F1, F2, F3).

A su vez, se pudo confirmar que tanto Ang1, Ang2, como su cociente, eran muy eficientes como biomarcadores de CH ( $F > 3$ ), ya que mostraron diferencias significativas entre pacientes con estadio F3 vs. F4. Además, el valor del cociente de Ang2/Ang1 aumentó significativamente en pacientes con estadio F2 frente a F1 lo que podría ser valioso para diferenciar a pacientes sin fibrosis significativa.

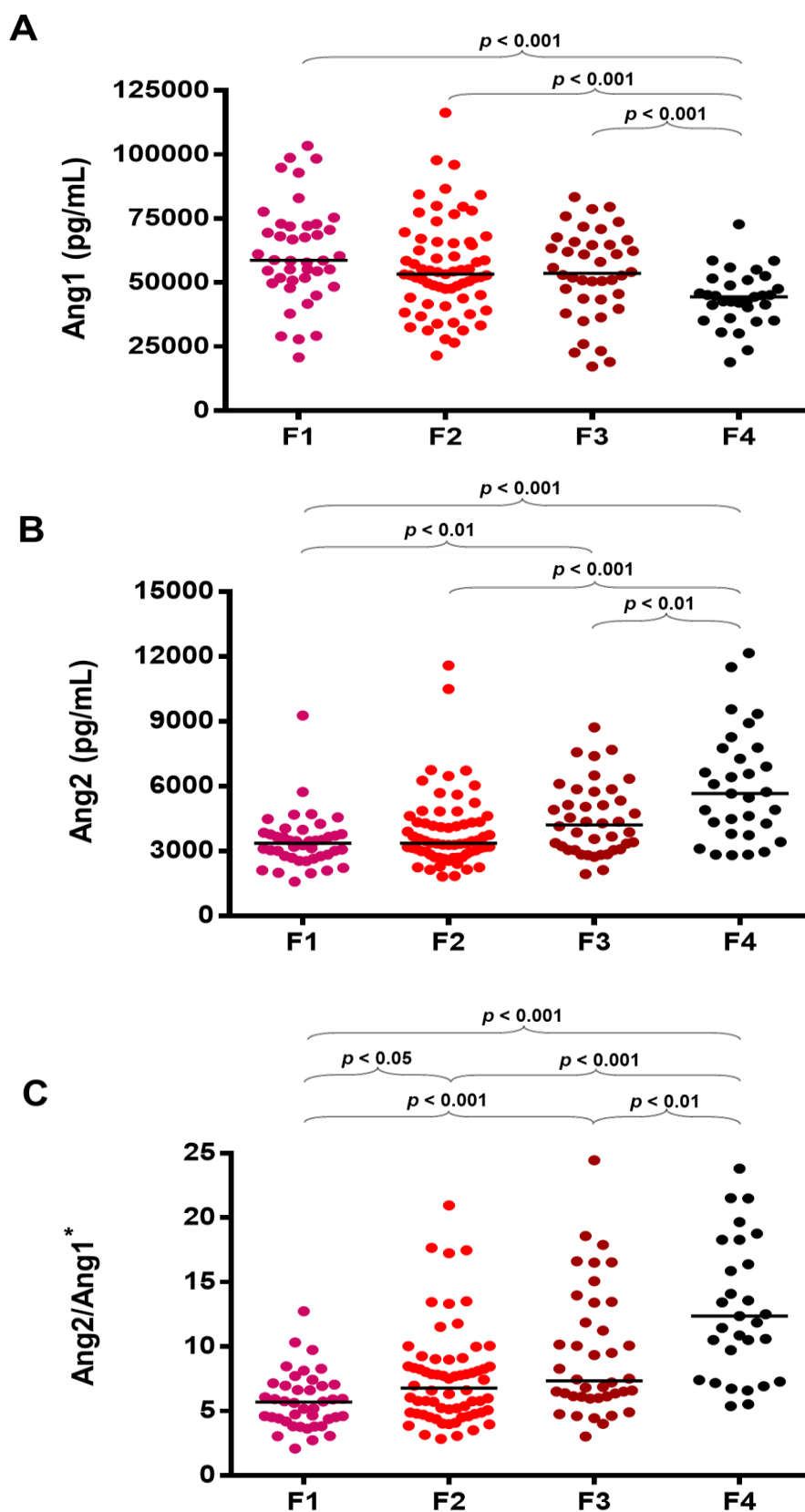


Figura 19. Asociación entre las concentraciones séricas de Ang1, Ang2, cociente Ang2/Ang1 y estadio de fibrosis en la población total de pacientes con HCC.

\*Los datos de Ang2/Ang1 se muestran multiplicados por un factor de 100.



Se observó una correlación significativa de Ang2 con el grado de inflamación y estadio de fibrosis. En cambio, Ang1 y el cociente Ang2/Ang1 se relacionaban únicamente con la FH aunque de forma muy significativa (**Tabla 17**).

**Tabla 17. Correlación entre las concentraciones séricas de Ang1, Ang2, cociente Ang2/Ang1 respecto a la actividad inflamatoria y estadio de fibrosis en la población total de pacientes con HCC**

VARIABLES	Coeficiente <i>Pearson</i>	<i>p</i>
<b>GRADO DE INFLAMACION (n = 155)</b>		
Ang1	-0.151	0.06
Ang2	0.158	0.05
Cociente Ang2/Ang1	0.128	0.1
<b>ESTADIO DE FIBROSIS (n = 179)</b>		
Ang1	-0.294	$6.61 \times 10^{-5}$
Ang2	0.415	$7.56 \times 10^{-9}$
Cociente Ang2/Ang1	0.400	$2.78 \times 10^{-8}$

Ang1 = angiopoyetina 1; Ang2 = angiopoyetina 2.

### 2.3.2 Comparación de AS con otros índices de FH

Se calcularon otros índices no invasivos de FH previamente descritos en la literatura: APRI, FIB4, KING, AAR, GUCI, LOK, Forns, FI y FCI en la muestra total de pacientes con HCC (n=179) para comparar sus capacidades diagnósticas con la de AS.

En primer lugar, se analizó la correlación de todos los índices con la FH. Como se puede apreciar en la **Tabla 18**, AS obtuvo un valor de correlación con la FH muy superior al del resto de índices ( $p = 1.68 \times 10^{-37}$ ). Interesantemente todos los índices analizados presentaron una buena asociación con la FH, siendo el índice AAR la prueba que obtuvo una menor asociación en la población de pacientes estudiada.

**Tabla 18. Correlación entre los diferentes índices y FH**

INDICES	Coeficiente Pearson	<i>p</i>
AS	0.779	$1.68 \times 10^{-37}$
APRI	0.596	$1.72 \times 10^{-18}$
FIB4	0.592	$7.24 \times 10^{-18}$
KING	0.590	$4.70 \times 10^{-18}$
AAR	0.199	0.008
GUCI	0.612	$1.16 \times 10^{-19}$
LOK	0.527	$4.25 \times 10^{-14}$
Forns <sup>a</sup>	0.667	$1.27 \times 10^{-23}$
FI <sup>b</sup>	0.469	$1.29 \times 10^{-10}$
FCI <sup>c</sup>	0.344	$4.96 \times 10^{-6}$

AS =AngioScore (Ang2, plaquetas, AST, GGT, INR, edad)<sup>236</sup>; APRI (AST, Plaquetas)<sup>205</sup>; FIB4 (edad, AST, plaquetas, ALT)<sup>229</sup>; KING (edad, AST, INR, plaquetas)<sup>230</sup>; AAR (AST, ALT)<sup>231</sup>; GUCI (AST, INR, plaquetas)<sup>232</sup>; LOK (plaquetas, AST, ALT, INR)<sup>233</sup>; Forns (plaquetas, GGT, edad, colesterol)<sup>210</sup>; FI (plaquetas, albúmina)<sup>234</sup>; FCI (fosfatasa alcalina, bilirrubina total, albúmina, plaquetas)<sup>235</sup>; n = 178 pacientes con HCC excepto para <sup>a</sup>n = 173; <sup>b</sup>n=169; <sup>c</sup>n = 168.

El análisis de la capacidad diagnóstica de AS y de cada índice para detectar FH se realizó a través del análisis de curvas AUC-ROC. AS mostró un valor de AUC superior a 0.8 para F>1 y a 0.9 para F>2 y F>3. El mayor valor de AUC-

ROC de AS refleja su mayor capacidad predictiva frente al resto de las pruebas no invasivas para discriminar a cada uno de los estadios de FH. Asimismo, la comparación de los valores de AUC-ROC entre los distintos índices reflejó la superioridad de AS para discriminar los estadios de FH, siendo en  $F>2$  donde AS obtuvo diferencias significativas (*Long test*,  $p<0.05$ ) con un mayor número de índices (APRI, AAR, GUCI, LOK, Forns, FI y FCI). Estos resultados se muestran en la **Tabla 19**.

**Tabla 19. Comparación de las curvas AUC-ROC de AS y el resto de índices no invasivos de fibrosis hepática en la población total de pacientes con HCC analizada**

INDICES	AUC-ROC (IC 95%)	EEM	<i>p</i>
<b>F&gt;1</b>			
<b>AS</b>	<b>0.886 (0.829-0.928)</b>	<b>0.0273</b>	<b>N/A</b>
APRI	0.822 (0.758-0.875)	0.0359	<b>0.01</b>
FIB4	0.855 (0.795-0.903)	0.0312	0.2
KING	0.855 (0.795-0.903)	0.0315	0.1
AAR	0.554 (0.477-0.628)	0.0533	<b>&lt;0.0001</b>
GUCI	0.816 (0.751-0.870)	0.0362	<b>0.004</b>
LOK	0.683 (0.609-0.750)	0.0478	<b>&lt;0.0001</b>
Forns <sup>a</sup>	0.860 (0.799-0.908)	0.0322	0.2
FI <sup>b</sup>	0.675 (0.598-0.745)	0.0456	<b>&lt;0.0001</b>
FCI <sup>c</sup>	0.522 (0.443-0.599)	0.0513	<b>&lt;0.0001</b>
<b>F&gt;2</b>			
<b>AS</b>	<b>0.920 (0.870-0.955)</b>	<b>0.0204</b>	<b>N/A</b>
APRI	0.882 (0.825-0.925)	0.0260	<b>0.04</b>
FIB4	0.880 (0.823-0.924)	0.0249	0.06
KING	0.896(0.842-0.937)	0.0229	0.1
AAR	0.617 (0.542-0.689)	0.0435	<b>&lt;0.0001</b>
GUCI	0.881 (0.825-0.925)	0.0260	<b>0.03</b>
LOK	0.771 (0.702-0.831)	0.0356	<b>&lt;0.0001</b>
Forns <sup>a</sup>	0.857 (0.796-0.905)	0.0277	<b>0.003</b>
FI <sup>b</sup>	0.764 (0.693-0.826)	0.0392	<b>0.0001</b>
FCI <sup>c</sup>	0.696 (0.621-0.765)	0.0424	<b>&lt;0.0001</b>

Tabla 19. Cont.

F>3			
AS	0.923 (0.873- 0.957)	0.0217	N/A
APRI	0.887 (0.831-0.930)	0.0254	0.08
FIB4	0.858 (0.798-0.906)	0.0316	<b>0.01</b>
KING	0.878 (0.821-0.923)	0.0269	<b>0.03</b>
AAR	0.643 (0.568-0.713)	0.0503	<b>&lt;0.0001</b>
GUCI	0.896 (0.841-0.936)	0.0244	0.16
LOK	0.882 (0.825-0.926)	0.0328	0.1
Forns <sup>a</sup>	0.849 (0.787-0.899)	0.0335	<b>0.004</b>
FI <sup>b</sup>	0.805 (0.737-0.861)	0.0476	<b>0.001</b>
FCI <sup>c</sup>	0.750 (0.677-0.813)	0.0538	<b>0.0006</b>

AS =AngioScore (Ang2, plaquetas, AST, GGT, INR, edad)<sup>236</sup>; APRI (AST, Plaquetas)<sup>205</sup>; FIB4 (edad, AST, plaquetas, ALT)<sup>229</sup>; KING (edad, AST, INR, plaquetas)<sup>230</sup>; AAR (AST, ALT)<sup>231</sup>; GUCI (AST, INR, plaquetas)<sup>232</sup>; LOK (plaquetas, AST, ALT, INR)<sup>233</sup>; Forns (plaquetas, GGT, edad, colesterol)<sup>210</sup>; FI (plaquetas, albúmina)<sup>234</sup>; FCI (fosfatasa alcalina, bilirrubina total, albúmina, plaquetas)<sup>235</sup>; n = 178 pacientes con HCC excepto para <sup>a</sup>n = 173; <sup>b</sup>n=169; <sup>c</sup>n = 168; EEM, Error estándar de la media; N/A, no aplica; Valor *p* bilateral por Test *De Long*.

En la **Tabla 20** se muestran los parámetros de valoración de la capacidad diagnóstica para detectar FH de AS y de otros índices de fibrosis. AS obtuvo unos valores de sensibilidad y especificidad elevados para cada uno de los estadios de FH (F>1, F>2 y F>3) por encima de un 79.41% de sensibilidad y un 78.91% de especificidad, alcanzándose la máxima suma conjunta de ambos valores (sensibilidad 81.43% y especificidad 91.67%) en el punto de corte (índice de *Youden*) >2.3967 para la detección de pacientes con una fibrosis intermedia (F>2). Los otros índices presentaron, en sus correspondientes índices de *Youden*, unos valores de sensibilidad inferior al de AS, excepto en el

caso de  $F > 1$ , donde LOK obtuvo un valor de sensibilidad ligeramente superior (82.35%); sin embargo su valor de especificidad fue bastante peor (42.86%) que el de AS (83.33%). En  $F > 2$  varios índices (KING, GUCI y Forns) mostraron una sensibilidad superior (87.14%, 82.86% y 91.18%, respectivamente) respecto a AS (81.43%) pero su valor de especificidad (75.93%, 82.41% y 68.57%, respectivamente) fue inferior al comprar con el valor de especificidad de AS (91.67%). En el caso de  $F > 3$ , tanto APRI como GUCI obtuvieron un valor más alto de sensibilidad (100%) que AS (96.77%) pero la especificidad que mostraron fue menor que la de AS.

De forma interesante, AS obtuvo una superior capacidad diagnóstica respecto al resto de índices estudiados para discriminar correctamente tanto a pacientes con mínima fibrosis como a pacientes cirróticos e incluso a sujetos con fibrosis en estadios intermedios. Particularmente, AS mostró en todos los casos unos valores elevados de eficacia diagnóstica (precisión prueba diagnóstica, PPD) respecto a los otros índices para diferenciar cada uno de los estadios de fibrosis ( $F > 1$ , 81.5%;  $F > 2$ , 89% y  $F > 3$ , 81.1%).

Tabla 20. Eficacia de AngioScore y otros índices para detectar el estadio de FH de pacientes con HCC

F>1															
INDICES	AUC-ROC (95% IC)	Cutoff <sup>a</sup>	S (%)	IC 95%	E (%)	IC 95%	RPP (%)	IC 95%	RPN (%)	IC 95%	VPP (%)	IC 95%	VPN (%)	IC 95%	PPD (%)
AS	0.886 (0.829-0.928)	>1.9248	79.41	71.6 - 85.9	83.33	68.6 - 93.0	4.76	2.4 - 9.4	0.25	0.2 - 0.4	81.5	71.4 - 89.2	81.4	72.1 - 88.7	81.5
APRI	0.822 (0.758-0.875)	>0.7158	58.09	49.3 - 66.5	90.48	77.4 - 97.3	6.10	2.4 - 15.7	0.46	0.4 - 0.6	84.9	73.1 - 93.0	70.0	61.0 - 78.1	74.9
FIB4	0.855 (0.795-0.903)	>1.2030	72.06	63.7 - 79.4	83.33	68.6 - 93.0	4.32	2.2 - 8.6	0.34	0.2 - 0.5	80.0	69.2 - 88.3	76.4	66.9 - 84.3	77.9
KING	0.855 (0.795-0.903)	>10.647	72.06	63.7 - 79.4	85.71	71.5 - 94.6	5.04	2.4 - 10.7	0.33	0.2 - 0.4	82.3	71.7 - 90.2	76.9	67.5 - 84.6	79.2
AAR	0.554 (0.447-0.628)	>0.6486	54.01	45.3 - 62.6	61.90	45.6 - 76.4	1.42	0.9 - 2.1	0.74	0.6 - 1.0	56.7	45.2 - 67.7	59.3	48.9 - 69.2	58.1
GUCI	0.816 (0.751-0.870)	>30.4200	57.35	48.6 - 65.8	92.86	80.5 - 98.5	8.03	2.7 - 24.1	0.46	0.4 - 0.6	88.1	76.5 - 95.3	70.2	61.3 - 78.2	75.8
LOK	0.683 (0.609-0.750)	>-1.5009	82.35	74.9 - 88.4	42.86	27.7 - 59.0	1.44	1.1 - 1.9	0.41	0.2 - 0.7	57.1	47.9 - 66.0	72.5	58.6 - 83.7	61.8
Forns <sup>b</sup>	0.860 (0.799-0.908)	>4.5887	78.03	70.0 - 84.8	82.93	67.9 - 92.8	4.57	2.3 - 9.0	0.26	0.2 - 0.4	80.8	70.5 - 88.8	80.4	70.8 - 87.9	80.6
FI <sup>c</sup>	0.675 (0.598-0.745)	>1.8300	48.46	39.6 - 57.4	89.74	75.8 - 97.1	4.73	1.8 - 12.2	0.57	0.5 - 0.7	81.3	67.5 - 91.1	65.4	56.1 - 73.8	69.9
FCI <sup>d</sup>	0.522 (0.443-0.599)	>0.1943	20.00	13.5 - 27.9	94.74	82.3 - 99.4	3.80	0.9 - 15.3	0.84	0.8 - 0.9	77.8	53.9 - 93.0	56.2	47.8 - 64.4	58.9

**Tabla 20. Cont. Eficacia de AngioScore y otros índices para detectar el estadio de FH de pacientes con HCC**

F>2															
INDICES	AUC-ROC (95% IC)	Cutoff <sup>a</sup>	S (%)	IC 95%	E (%)	IC 95%	RPP (%)	IC 95%	RPN (%)	IC 95%	VPP (%)	IC 95%	VPN (%)	IC 95%	PPD (%)
AS	0.920 (0.870-0.955)	>2.3967	81.43	70.3 - 89.7	91.67	84.8 - 96.1	9.77	5.2 - 18.4	0.20	0.1 - 0.3	77.4	63.1 - 88.2	93.4	87.6 - 97.0	89.0
APRI	0.882 (0.825-0.925)	>0.8069	80.00	68.7 - 88.6	86.11	78.1 - 92.0	5.76	3.5 - 9.3	0.23	0.1 - 0.4	66.9	52.9 - 79.0	92.5	86.2 - 96.5	84.5
FIB4	0.880 (0.823-0.924)	>1.7538	72.86	60.9 - 82.8	87.04	79.2 - 92.7	5.62	3.4 - 9.4	0.31	0.2 - 0.5	66.4	51.6 - 79.1	90.1	83.6 - 94.7	83.4
KING	0.896 (0.842-0.937)	>12.8571	87.14	77.0 - 93.9	75.93	66.7 - 83.6	3.62	2.6 - 5.1	0.17	0.09 - 0.3	56.0	43.8 - 67.7	94.4	88.1 - 97.9	78.8
AAR	0.617 (0.542-0.689)	>0.7363	45.07	33.2 - 57.3	77.78	68.8 - 85.2	2.03	1.3 - 3.1	0.71	0.6 - 0.9	41.6	27.8 - 56.4	80.1	72.1 - 86.6	69.3
GUCI	0.881 (0.825-0.925)	>32.137	82.86	72.0 - 90.8	82.41	73.9 - 89.1	4.71	3.1 - 7.2	0.21	0.1 - 0.4	62.3	49.0 - 74.4	93.2	87.0 - 97.0	82.5
LOK	0.771 (0.702-0.831)	>-0.7447	70.00	57.9 - 80.4	75.00	65.7 - 82.8	2.80	2.0 - 4.0	0.40	0.3 - 0.6	49.6	36.9 - 62.3	87.7	80.1 - 93.1	73.7
Forns <sup>b</sup>	0.857 (0.796-0.905)	>5.0262	91.18	81.8 - 96.7	68.57	58.8 - 77.3	2.90	2.2 - 3.9	0.13	0.06 - 0.3	50.5	39.1 - 61.8	95.7	89.2 - 98.8	74.4
FI <sup>c</sup>	0.764 (0.693-0.826)	>1.8300	70.77	58.2 - 81.4	79.81	70.8 - 87.0	3.50	2.3 - 5.3	0.37	0.2 - 0.5	55.2	41.3 - 68.5	88.6	81.2 - 93.8	77.5
FCI <sup>d</sup>	0.696 (0.621-0.765)	>0.1513	47.69	35.1 - 60.5	84.47	76.0 - 90.9	3.07	1.8 - 5.2	0.62	0.5 - 0.8	51.9	35.6 - 67.9	82.1	74.3 - 88.4	74.9



**Tabla 20. Cont. Eficacia de AngioScore y otros índices para detectar el estadio de FH de pacientes con HCC**

F>3															
INDICES	AUC-ROC (95% IC)	Cutoff <sup>a</sup>	S (%)	IC 95%	E (%)	IC 95%	RPP (%)	IC 95%	RPN (%)	IC 95%	VPP (%)	IC 95%	VPN (%)	IC 95%	PPD (%)
AS	0.923 (0.873-0.957)	>2.5393	96.77	83.3 - 99.9	78.91	71.4 - 85.2	4.59	3.3 - 6.3	0.041	0.006 - 0.3	38.5	25.5 - 52.9	99.4	96.0 - 100.0	81.1
APRI	0.887 (0.831-0.930)	>0.7401	100.00	88.8 - 100	67.35	59.1 - 74.8	3.06	2.4 - 3.9	0	-	29.5	19.3 - 41.4	100.0	96.5 - 100.0	71.3
FIB4	0.858 (0.978-0.906)	>1.5558	93.55	78.6 - 99.2	70.07	62.0 - 77.3	3.13	2.4 - 4.1	0.092	0.02 - 0.4	29.9	19.2 - 42.4	98.8	94.5 - 99.9	72.9
KING	0.878 (0.821-0.923)	>16.6327	90.32	74.2 - 98.0	73.47	65.6 - 80.4	3.40	2.5 - 4.6	0.13	0.04 - 0.4	31.7	20.3 - 45.0	98.2	93.9 - 99.8	75.5
AAR	0.643 (0.568-0.713)	>0.5444	96.77	83.3 - 99.9	31.08	23.7 - 39.2	1.40	1.2 - 1.6	0.10	0.01 - 0.7	16.1	10.2 - 23.6	98.6	90.2 - 100.0	39.0
GUCI	0.896 (0.841-0.936)	>32.9412	100.00	88.8 - 100	70.07	62.0 - 77.3	3.34	2.6 - 4.3	0	-	31.3	20.6 - 43.7	100.0	96.7 - 100.0	73.7
LOK	0.882 (0.825-0.926)	>-0.3791	83.87	66.3 - 94.5	85.71	79.0 - 90.9	5.87	3.8 - 9.0	0.19	0.08 - 0.4	44.5	28.8 - 61.0	97.5	93.3 - 99.4	85.5
Forns <sup>b</sup>	0.849 (0.787-0.899)	>6.5692	70.00	50.6 - 85.3	85.31	78.4 - 90.7	4.77	3.0 - 7.5	0.35	0.2 - 0.6	39.4	23.6 - 57.0	95.4	90.4 - 98.3	83.5
FI <sup>c</sup>	0.805 (0.737-0.861)	>2.0300	75.86	56.5 - 89.7	79.29	71.6 - 85.7	3.66	2.5 - 5.4	0.30	0.2 - 0.6	33.3	20.1 - 48.7	96.0	90.8 - 98.7	78.9
FCI <sup>d</sup>	0.750 (0.677-0.813)	>0.2069	48.28	29.4 - 67.5	92.81	87.2 - 96.5	6.71	3.3 - 13.6	0.56	0.4 - 0.8	47.8	25.3 - 70.9	92.9	87.5 - 96.5	87.5

<sup>a</sup>Cutoff = Punto de corte más favorable de relación entre sensibilidad-especificidad (Índice de *Youden*); S = Sensibilidad; E = Especificidad; RPP = Razón de Probabilidad Positiva; RPN = Razón de Probabilidad Negativa; VPP = Valor Predictivo Positivo; VPN = Valor Predictivo Negativo; PPD = Precisión de la Prueba Diagnóstica. AS =AngioScore (Ang2, plaquetas, AST, GGT, INR, edad)<sup>236</sup>; APRI (AST, Plaquetas)<sup>205</sup>; FIB4 (edad, AST, plaquetas, ALT)<sup>229</sup>; KING (edad, AST, INR, plaquetas)<sup>230</sup>; AAR (AST, ALT)<sup>231</sup>; GUCI (AST, INR, plaquetas)<sup>232</sup>; LOK (plaquetas, AST, ALT, INR)<sup>233</sup>; Forns (plaquetas, GGT, edad, colesterol)<sup>210</sup>; FI (plaquetas, albúmina)<sup>234</sup>; FCI (fosfatasa alcalina, bilirrubina total, albúmina, plaquetas)<sup>235</sup>; n = 178 pacientes con HCC excepto para <sup>b</sup>n = 173; <sup>c</sup>n=169; <sup>d</sup>n = 168.

Además de calcular el índice de *Youden*, en cada estadio de fibrosis se seleccionaron otros dos puntos de corte: elegimos un punto de corte con un valor de sensibilidad superior al 90% usado para predecir con elevada certeza la ausencia de la enfermedad (estadio de FH) y otro punto de corte con una especificidad mayor del 90% usado para predecir con gran seguridad la presencia de la enfermedad (estadio de FH). En ambos puntos de corte, AS también mostró una mayor exactitud diagnóstica que los otros índices para discriminar a pacientes con fibrosis significativa ( $F>1$ ), fibrosis moderada ( $F>2$ ) y fibrosis grave ( $F>3$ ). En  $F>1$ , AS mostró una eficacia diagnóstica similar (76.8% y 76.3%, respectivamente) para los puntos de corte con sensibilidad  $>90\%$  y especificidad  $>90\%$ . Asimismo, AS obtuvo el mejor valor de PPD (76.8%) para el punto de corte de sensibilidad  $>90\%$ , respecto a los otros índices. En el caso de  $F>2$ , AS presentó un valor superior de PPD (88.3%) en el punto de corte de especificidad  $>90\%$  en comparación al que obtuvo en el punto de corte de sensibilidad  $>90\%$  (74.8%). Interesantemente, en ambos puntos de corte, AS mostró una precisión diagnóstica superior al resto de índices, excepto KING que fue ligeramente superior en el punto de corte  $>90\%$  de sensibilidad. Por último, para detectar cirrosis, AS mostró una excelente precisión, superior al resto de índices tanto en el punto de corte de sensibilidad  $>90\%$  (83.3%) como en el punto de corte de especificidad  $>90\%$  (88.5%). Por último, en el punto de corte correspondiente al criterio óptimo, AS también mostró una exactitud diagnóstica superior al resto de índices comparados excepto para detectar cirrosis ( $F>3$ ), donde los índices GUCI y FCI obtuvieron valores de PPD ligeramente mayores (91.1% y 91.7% vs. 90.7%, respectivamente); sin embargo, los correspondientes valores de sensibilidad

fueron claramente inferiores que el de AS (35.48% y 31.03% vs. 67.74%, respectivamente) (**Anexo II**).

### **3. EXPRESIÓN DE ANG2 EN REPLICONES DEL VHC**

Se evaluó la concentración y expresión de la proteína Ang2 mediante las técnicas de *Western Blotting* y ELISA en distintos replicones del VHC que expresaban el genoma completo del VHC (replicones VHC-C1 y VHC-C5) y en otros que codificaban exclusivamente las proteínas no estructurales virales (replicones subgenómicos VHC-NS18 y VHC-NS19). Además, también se midió la expresión de Ang2 en la línea celular Huh7 sin transfectar (línea parental). Como se puede apreciar en la **Figura 20**, la expresión de Ang2 fue significativamente mayor tanto en los replicones genómicos como subgenómicos, respecto a la línea celular Huh7.

La detección de la proteína no estructural NS5A se empleó para confirmar la expresión del genoma viral en los replicones genómicos y subgenómicos (**Figura 21**).

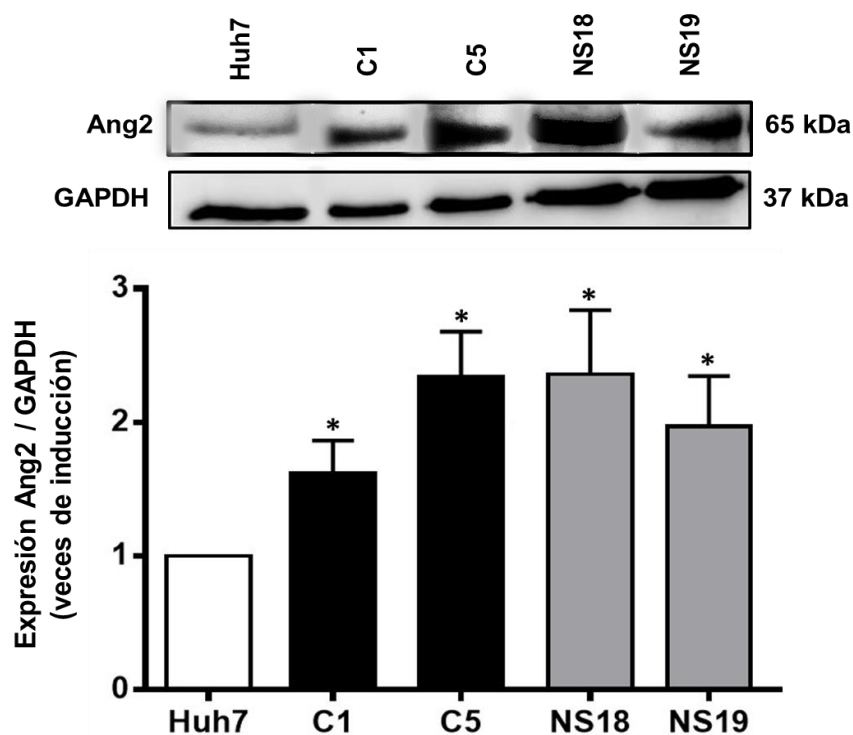


Figura 20. Expresión de Ang2 en replicones genómicos y subgenómicos.

\* $p < 0.05$  vs. Huh7.

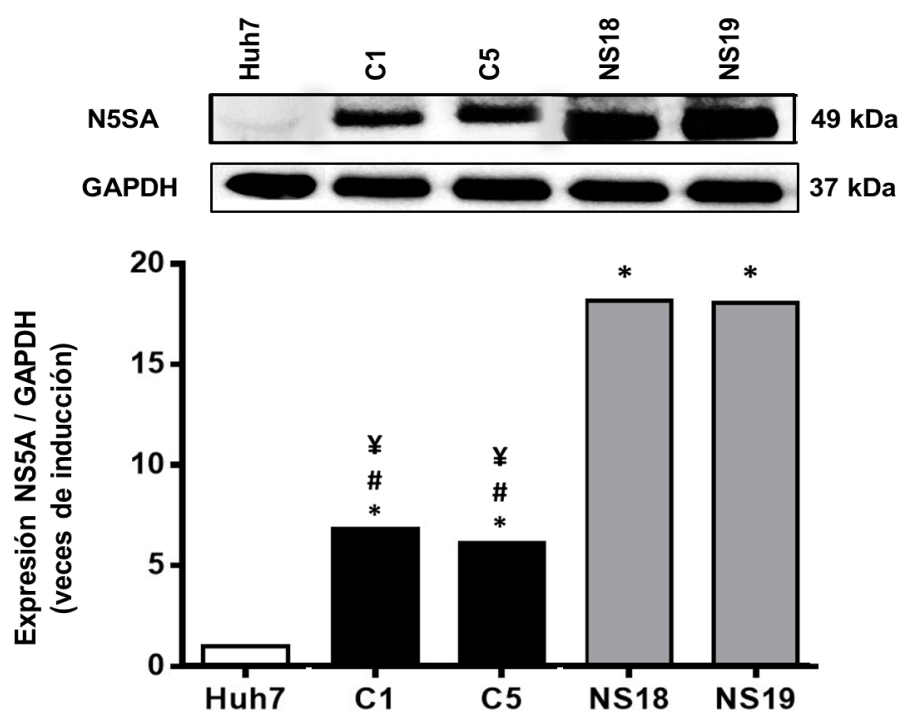
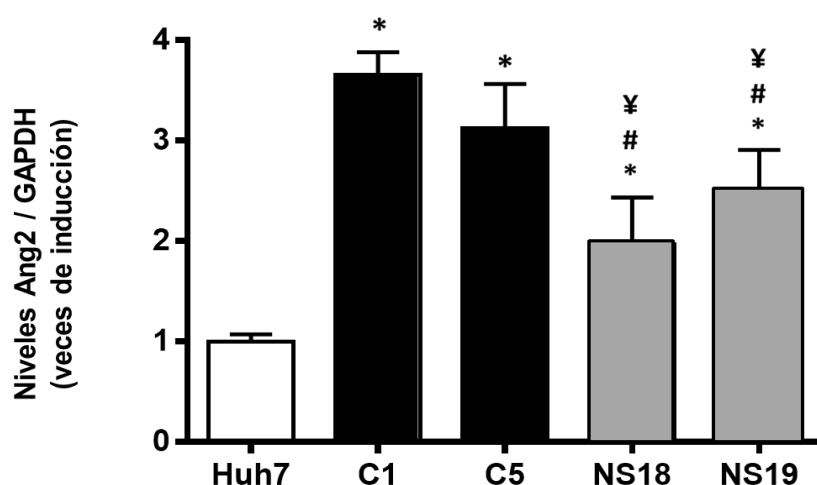


Figura 21. Expresión de NS5A en replicones del VHC genómicos y subgenómicos.

\* $p < 0.05$  vs. Huh7; <sup>‡</sup> $p < 0.05$  vs. replicón VHC-NS18; <sup>\*</sup> $p < 0.05$  vs. replicón VHC-NS19.

El análisis cuantitativo de la expresión de Ang2 en los homogenados de los replicones hepáticos mediante ELISA reflejó que aquéllos que expresaban el genoma completo del virus (VHC-C1 y VHC-C5) expresaban también niveles superiores de Ang2 que los replicones subgenómicos (VHC-NS18 y VHC-NS19) y la línea Huh7 (**Figura 22**).



**Figura 22. Niveles de Ang2 en replicones del VHC genómicos y subgenómicos. Los datos son representativos de tres experimentos diferentes.**

\* $p < 0.05$  vs. Huh7; # $p < 0.05$  vs. replicón VHC-C1; ¥ $p < 0.05$  vs. replicón VHC-C5.

### 3.1 Implicación de las vías de señalización PI3K y MAPK en la expresión de Ang2

La concentración de Ang2 se analizó por ensayos de ELISA en replicones celulares del VHC después de la administración de 2 inhibidores que son capaces de bloquear la vía de señalización PI3K (Ly294002), y la vía MAPK (PD98059).

La inhibición de la ruta de señalización celular PI3K con el inhibidor Ly294002 provocó un descenso en la expresión de Ang2 en todos los replicones del VHC estudiados, siendo este cambio significativo en todos los casos, a excepción del replicón VHC-C5 (**Figura 23A**).

Por su parte, la inhibición de la vía de señalización MAPK mediante el inhibidor PD98059 indujo en los replicones subgenómicos una bajada de la expresión Ang2; sin embargo, en los replicones genómicos su expresión se incrementó de manera significativa (**Figura 23B**).

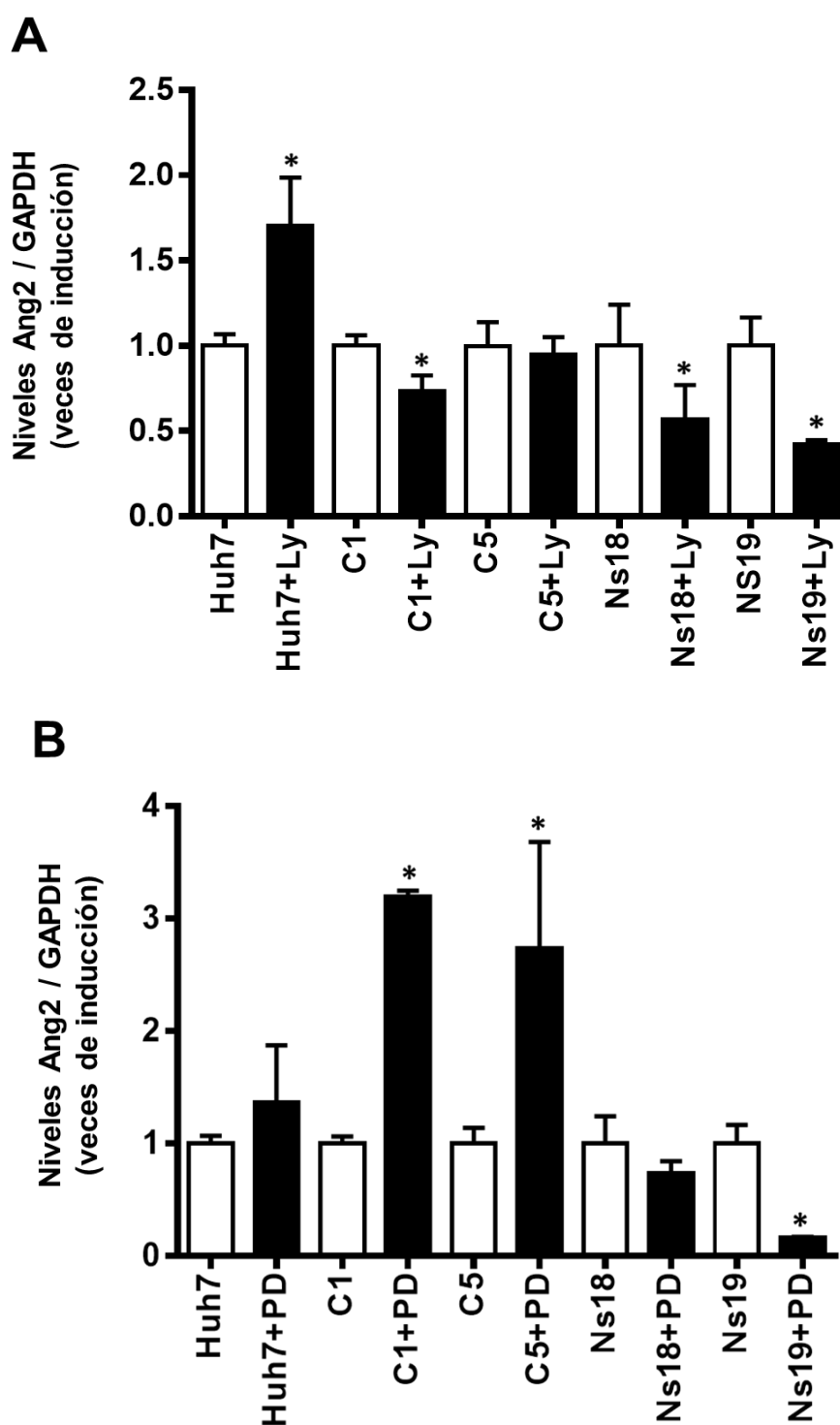


Figura 23 (A-B). Niveles de Ang2 en replicones genómicos y subgenómicos con y sin inhibidores.

\* $p < 0.05$  vs. su correspondiente línea celular sin inhibidor. Los datos son representativos de tres experimentos diferentes.

---

---

## DISCUSIÓN

*“No basta con adquirir sabiduría, es preciso además saber usarla.”*

*Marco Tulio Cicerón (106 A.C.-43 A.C.).*



## VI. DISCUSIÓN

En el transcurso de la HCC se produce la constante activación de fenómenos inflamatorios, angiogénicos y fibrogénicos que perpetúan el daño tisular y fomentan evolución de la HCC hasta sus últimas etapas, CH y CHC.

En el presente trabajo de investigación se pudo comprobar un notable desequilibrio del sistema Angiopoyetinas/Tie2 en pacientes con HCC, vía de señalización celular esencial para la regulación de la quiescencia vascular. La concentración intrahepática y periférica de angiopoyetinas mostró importantes diferencias en relación a la progresión de la HCC, con un considerable descenso de los niveles séricos de Ang1 y un importante incremento del factor proangiogénico y proinflamatorio, Ang2. Dicho hallazgo permitió construir, junto a otras variables clínicas y demográficas relacionadas, un nuevo índice no invasivo de fibrosis, AS, que mostró un gran potencial para el diagnóstico y monitorización no invasiva de la enfermedad a tenor de su demostrada superioridad en comparación con otros índices previamente descritos en la literatura.

Asimismo, se pudo observar la sobreexpresión *in vitro* de Ang2 en los replicones genómicos y subgenómicos del VHC, lo que confirma la influencia de la expresión del genoma del virus en la inducción de la expresión del mencionado factor proangiogénico.

Los resultados mostraron una correlación significativa entre las concentraciones séricas de angiopoyetinas (Ang1, Ang2 y cociente Ang2/Ang1) y el estadio de FH sugiriendo que existe una importante asociación entre estas

variables. Ang1 correlacionó inversa y significativamente con el estadio de fibrosis, mientras que Ang2 mostró una importante y directa asociación con la actividad necroinflamatoria y el estadio de FH, resultados que coinciden con otros estudios previos. En este sentido, nuestro grupo demostró la presencia de concentraciones séricas incrementadas de marcadores angiogénicos (VEGF, Ang2 y Tie2) en pacientes con HCC que disminuían después de recibir tratamiento antiviral combinado (interferón pegilado/ribavirina), lo que señalaba la notable utilidad de estos marcadores angiogénicos como herramienta predictiva de respuesta terapéutica de la HCC<sup>125</sup>. En otro estudio se demostró un incremento en las concentraciones séricas de VEGF y Ang2 a diferentes tiempos del tratamiento de pacientes con HCC tratados con interferón pegilado/ribavirina<sup>122</sup>, coincidiendo con nuestros hallazgos previos; además, y de forma interesante, otros autores sugirieron la asociación de la concentración de Ang2 con el estadio de FH y la respuesta viral sostenida al tratamiento<sup>145</sup>. Recientemente, Pauta y col. analizaron el potencial de Ang2 como diana terapéutica y observaron altos niveles de Ang2 en la circulación sistémica y suprahepática en pacientes con cirrosis<sup>237</sup>. De forma interesante, estos autores también apreciaron que la inhibición de Ang2 era un tratamiento efectivo y seguro para la normalización vascular y atenuación del infiltrado inflamatorio hepático en ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCL<sub>4</sub>). En otro estudio retrospectivo, se demostró que las concentraciones séricas de Ang2 se encontraban elevadas en pacientes con cirrosis respecto a sujetos control ( $p < 0.0001$ ), implicando al sistema Angiopoyetinas/Tie2 en la neoangiogenesis asociada a la cirrosis y sugiriendo el potencial de Ang2 como marcador para la detección de cirrosis y CHC<sup>238</sup>. Todas estas evidencias revelan una estrecha

asociación entre la angiogénesis y la progresión de la HCC y señalan la relevancia de los mediadores angiogénicos como valiosas herramientas de pronóstico, diagnóstico y posibles dianas terapéuticas de la HCC<sup>90,176,239-242</sup>.

Los resultados obtenidos en las muestras de tejido hepático revelaron nuevamente un evidente desequilibrio de expresión de las angiopoyetinas: a pesar de que los niveles de Ang1 no mostraron diferencias importantes entre los pacientes con HCC y los sujetos control, los niveles de Ang2 y el cociente Ang2/Ang1 estaban aumentados significativamente en los pacientes con HCC. Nuestro grupo había descrito previamente la existencia de angiogénesis intrahepática en el curso de otras hepatopatías crónicas como la CBP<sup>95</sup> y otros autores demostraron un aumento significativo del ARNm<sup>175</sup> y de proteína<sup>243</sup> de Ang2 en el CHC, tumor hipervascularizado, mientras que no observaron diferencias en la expresión de Ang1 en comparación con el tejido hepático normal adyacente. Asimismo, *Mitsuhashi* y col., señalaron que el cociente Ang2/Ang1 se relacionaba estrechamente con el diámetro del tumor. Estas evidencias fueron contrastadas por *Zhao* y col., quienes obtuvieron resultados similares demostrando una mayor expresión de VEGF y Ang2 en biopsias de CHC en comparación con tejido hepático sano, sin apreciar diferencias significativas al comparar Ang1<sup>244</sup>. Hallazgos similares se han obtenido al estudiar otras lesiones tumorales originadas en órganos como riñón y tracto digestivo<sup>245,246</sup>, sugiriendo la relevancia de las angiopoyetinas en la promoción de la angiogénesis tumoral.

La estrecha relación entre angiogénesis hepática, el grado de inflamación y estadio de fibrosis en muestras de tejido hepático de pacientes con HCC y sujetos sanos se ha comprobado en otros estudios<sup>120,247</sup>. De este modo,

*Gabriel A y col*, observaron una correlación positiva entre CD34 (antígeno de expresión endotelial) y la actividad necroinflamatoria y estadio de fibrosis en biopsias hepáticas de pacientes con HCC<sup>124</sup>.

Este hecho concuerda con los datos obtenidos en nuestros experimentos con muestras de tejido hepático de pacientes con HCC y controles, donde Ang2 presentó una buena correlación con el grado de actividad necroinflamatoria y el estadio de fibrosis de los pacientes con HCC, lo que confirma el importante papel de Ang2 como factor proinflamatorio. En este sentido, se ha descrito que Ang2 es capaz de promover el reclutamiento y migración de las células de la serie mieloide (neutrófilos, monocitos) a la zona lesionada mediante su interacción con integrinas presentes en las CE, favoreciendo de esta forma la progresión de la HCC<sup>136,137</sup>.

De forma interesante, nuestros resultados mostraron una estrecha correlación entre los niveles de Ang2, intrahepáticos y periféricos, con la progresión de la HCC, tanto de actividad necroinflamatoria como de FH, lo que manifiesta su gran potencial como biomarcador no invasivo de la enfermedad.

Entre las angiopoyetinas más estudiadas (Ang1 y Ang2), diversos trabajos han descrito que en pacientes con cirrosis de varias etiologías, en pacientes con CHC, y actualmente en sujetos con HCC, las concentraciones séricas de Ang2 se encuentran significativamente incrementadas, reflejando su posible intervención en distintas fases de la progresión de la enfermedad promovida por la infección con el VHC<sup>94,95,138,238</sup>.

En base a estas evidencias, nos planteamos evaluar el valor predictivo independiente de las angiopoyetinas y en combinación con otros parámetros bioquímicos vinculados a la presencia de FH en una amplia cohorte de

pacientes con HCC (n=108). La elevada capacidad predictiva de Ang2 para discriminar entre los distintos estadios de FH [F>1, AUC-ROC 0.75 (IC 95%), 0.65-0.83; F>2, AUC-ROC 0.72 (IC 95%), 0.62-0.80; F>3, AUC-ROC 0.74 (IC 95%), 0.65-0.82] fue uno de nuestros principales hallazgos. El análisis combinado de este factor (Ang2) junto a otras variables demográficas y bioquímicas relacionadas significativamente con la progresión de la enfermedad (edad, INR, AST, GGT y plaquetas) permitió desarrollar un modelo matemático, AS, de gran precisión para el diagnóstico del estadio de FH. De forma interesante, todas las variables incluidas en el modelo habían sido previamente relacionadas de forma consistente con FH. La edad se asocia notablemente con la actividad histológica, necrosis-apoptosis y FH<sup>28</sup> y además se ha utilizado anteriormente como parte de otros índices predictivos<sup>210,229,230</sup>. Por su parte, tanto la GGT como el conteo plaquetario, también se han correlacionado con FH avanzada y esta última, a su vez, con hipertensión portal<sup>205,248,249</sup>. Asimismo, la elevación de AST se asoció con la FH avanzada; en cambio, no se apreció esta relación con los valores de ALT, quizás como resultado de un retraso en el aclaramiento de AST respecto a ALT o de un daño mitocondrial asociado con el avance de la enfermedad hepática que propiciaría una mayor liberación de AST que de ALT<sup>250,251</sup>. Asimismo, INR ya se había relacionado previamente con la función de síntesis hepática, progresión de la fibrosis y la pérdida de la masa hepatocitaria<sup>233</sup>.

La capacidad de AS para predecir cada uno de los estadios de FH en el Grupo de Estudio fue extremadamente buena, con un valor de AUC-ROC superior a 0.910 para F>1, F>2, y F>3. Asimismo, AS conservó una elevada capacidad

diagnóstica en el Grupo de Validación y, por tanto, en la población total de pacientes con HCC.

Adicionalmente, el nuevo índice mostró una excelente correlación con la FH y una buena capacidad de discriminar la progresión de fibrosis. En la comparación entre AS y otros índices no invasivos de fibrosis (APRI, FIB4, KING y AAR, GUCI, LOK, FORNS, FI, FCI) en la cohorte total de pacientes con HCC se pudo comprobar la superioridad de AS ya que los valores de las curvas AUC-ROC de AS fueron los más altos para el diagnóstico de  $F>1$  (0.886),  $F>2$  (0.920) y  $F>3$  (0.923). Es importante destacar que los valores de AUC-ROC de los otros índices analizados fueron análogos a los obtenidos en otros estudios<sup>252-254</sup>. De forma interesante, AS mostró unos buenos valores de sensibilidad ~85%, de especificidad ~80% y de precisión diagnóstica (PPD) ~80%, para cada uno de los distintos estadios de fibrosis analizados. Por tanto, AS constituye un método capaz de discriminar de forma no invasiva cada estadio de fibrosis con una notable precisión, siendo particularmente útil, tanto para la detección de pacientes con fibrosis grave (cirrosis), como para diferenciar etapas de fibrosis iniciales. Por otra parte, en los puntos de corte fijados con unos valores  $>90\%$  de sensibilidad y un  $>90\%$  de especificidad en cada curva ROC, el nuevo índice mantuvo una buena exactitud diagnóstica, con unos valores elevados de PPD para detectar FH, desde estadios mínimos hasta cirrosis (76.8% y 76.3%,  $F>1$ ; 74.8% y 88.3%,  $F>2$  y 83.3% y 88.5,  $F>3$ , respectivamente). Por lo tanto, estos datos reflejan que AS podría ser valioso no sólo para la correcta identificación de la cirrosis, que podría prevenir importantes complicaciones en relación al desarrollo de varices esofágicas, sino que también presenta una alta capacidad diagnóstica para diferenciar

pacientes sin fibrosis o con fibrosis mínima, que representa una de las mayores limitaciones de otros marcadores indirectos<sup>196,202</sup>.

Por tanto, la elevada precisión diagnóstica de AS, cercana a la de la propia BH, y su notable capacidad para discriminar los distintos estadios de FH en pacientes con HCC podría generar un considerable impacto en la historia natural de la enfermedad y en su intervención terapéutica<sup>202</sup> al permitir monitorizar la progresión de la enfermedad desde etapas incipientes.

A pesar de las diferencias en el tamaño muestral, AS (n = 179) mostró una notable precisión diagnóstica para los diferentes estadios de FH, en comparación a la mayoría de estudios realizados para evaluar FT (n = 373) y FS (n = 1046) que son por el momento los métodos no invasivos de fibrosis más utilizados<sup>253,255</sup>. Estos dos métodos no invasivos presentan varias limitaciones y desventajas. En el caso de FS son el coste del equipo, la necesidad de personal clínico con experiencia y la existencia de factores innatos del paciente, como la obesidad<sup>222-224</sup>. Por otro lado, en un estudio multicéntrico, se ha determinado que FS es útil para la detección de la cirrosis (AUC-ROC>0.90) pero es menos fiable en el diagnóstico correcto de la fibrosis significativa (AUC-ROC<0.80)<sup>256</sup>. En el caso de FT, su principal limitación es su elevado coste<sup>253</sup>.

En cambio, AS presenta múltiples ventajas frente a otros métodos de diagnóstico de FH como su alta precisión para diferenciar todos los estadios de fibrosis, su no invasividad, que podría ayudar a tomar decisiones clínicas en los pacientes durante el curso de la enfermedad, y reducido coste al no requerir el uso de equipos costosos para su realización. Además, su cálculo es muy sencillo ya que se obtiene fácilmente a partir de parámetros de rutina como

edad, INR, AST y GGT y plaquetas, y del análisis de los valores serológicos de Ang2, que podría ser igualmente automatizado.

A pesar de que este modelo mejoró significativamente la precisión de discriminación de fibrosis en comparación con otros índices no invasivos descritos, sería recomendable verificar la importancia de Ang2 como potencial biomarcador en la detección de fibrosis hepática en pacientes con HCC realizándose estudios adicionales en una población más amplia de pacientes.

Asimismo, AS podría ser una herramienta útil para el seguimiento de la progresión de otras enfermedades hepáticas crónicas ya que el factor Ang2 posee un elevado potencial diagnóstico y pronóstico en diferentes patologías asociadas con el remodelado vascular, como sucede en hepatopatías alcohólicas<sup>257</sup>.

De forma interesante, el estudio de los replicones del VHC reveló el papel de las proteínas virales en la activación *in vitro* de la expresión de Ang2

Estudios previos han confirmado que las proteínas estructurales del VHC (Core, E1 y E2) y las proteínas NS (NS3, NS4, NS5A) juegan un importante papel en la patogénesis de la enfermedad, al ser responsables de la activación de múltiples vías de señalización (PI3K, MAPK/ERK, etc.) y del aumento de estrés oxidativo<sup>258,259</sup>. Nuestros hallazgos indicarían que tanto las proteínas estructurales como NS del VHC podrían regular la activación de procesos angiogénicos mediante la estimulación de la síntesis de Ang2 ya que todos los replicones del VHC (genómicos y subgenómicos) aumentaron la expresión de Ang2 con respecto a la línea Huh7 sin transfectar, siendo este aumento mayor en los replicones genómicos. Este fenómeno sugiere un efecto aditivo de las proteínas estructurales y NS del VHC para activar diferentes vías de



señalización angiogénica. Estos datos coinciden con estudios previos donde se ha contrastado el importante papel tanto de la proteína Core como de NS5A para desencadenar la producción de diversos factores claves, tanto para el desarrollo de fibrosis (TGF- $\beta$ ), como de factores vinculados con la angiogénesis (VEGF) a través de múltiples vías de señalización, incluyendo PI3K, JNK/p38 y ERK<sup>165,260,261</sup>. Además, es importante resaltar la implicación de otras proteínas estructurales, E1 y E2, en el proceso de angiogénesis regenerativa y patológica<sup>165,170,262</sup>

La regulación de Ang2 por diversas vías de señalización celular podría ser un punto importante de control de quiescencia vascular en respuesta de microambiente tisular y podría contribuir al esclarecimiento los mecanismos moleculares implicados en la aparición y progresión de esta y otras enfermedades inflamatorias crónicas. La vía de señalización PI3K/AKT, implicada en la regulación de la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia celular, está directamente relacionada con el proceso angiogénico<sup>263</sup>. El bloqueo de esta ruta de señalización por medio del inhibidor Ly294002 indujo un descenso similar de los valores de Ang2 en todos los replicones de VHC analizados (genómicos y subgenómicos). Estos resultados sugieren que las proteínas no estructurales del VHC podrían ser responsables de la inducción de Ang2 por esta ruta de señalización. Estos datos son consistentes con los hallados en diversos estudios que han observado que el bloqueo de la señal PI3K/AKT se asocia con la inhibición de angiogénesis de tal manera que la proteína no estructural NS5A es capaz de inhibir la apoptosis a través de la unión a la subunidad p85 de PI3K que promueve la activación de

la proteína AKT, responsable de inducir angiogénesis mediante la activación de VEGF<sup>260,264,265</sup>.

Por otro lado, nuestros resultados señalan un descenso de la concentración de Ang2 en los replicones subgenómicos al bloquear la ruta MAPK/ERK con el inhibidor PD98059. Estos datos coinciden con los descritos por *Li B y col*<sup>266</sup>, quienes demostraron que el pretratamiento de células que expresaban la proteína no estructural NS3 con un inhibidor de la ruta de señalización ERK (PD98059), bloquea la activación de la proteína activadora 1 (AP-1), NF- $\kappa$ B y la proliferación celular, lo que indicaría que la proteína NS3 del VHC podría ser capaz de promover la proliferación celular a través de la ruta MAPK/ERK contribuyendo de esta forma al desarrollo del CHC. Otros estudios indican que otra proteína NS, NS5A, tiene la capacidad de modular esta misma ruta de señalización favoreciendo la replicación viral<sup>267,268</sup>. Nuestros datos sugieren que las proteínas NS lograrían también activar la síntesis de Ang2 a través de la vía de señalización MAPK/ERK.

En cambio, los replicones genómicos, que expresan todas las proteínas del VHC, mostraron un aumento de la expresión de Ang2 en presencia del inhibidor (PD98059). Este hecho podría ser debido a que la proteína estructural Core también es capaz de modular otras rutas de señalización celular. En concreto, Core induce un incremento de ROS<sup>157</sup> que tiene como principal consecuencia la activación de importantes rutas de transducción de señales, como son STAT3 y NF- $\kappa$ B. Estas vías de señalización contribuyen a la estabilización y activación de HIF-1 $\alpha$ , lo que promueve la estimulación de la expresión de VEGF y de otros factores angiogénicos<sup>165</sup>. Por lo tanto, a pesar de la inhibición de la ruta celular MAPK/ERK, Core podría seguir teniendo la

capacidad de inducir la síntesis de Ang2 y la angiogénesis mediante la activación compensatoria de vías de señalización celular alternativas **(Figura 24)**.

En resumen, este trabajo muestra la relación existente entre los niveles séricos e intrahepáticos de Ang2 con el avance de la HCC, lo que puede reflejar la alteración de la homeostasis vascular en el hígado de estos pacientes y constituir una importante diana de intervención terapéutica.

Asimismo, nuestro estudio sugiere que el nuevo índice no invasivo de FH, denominado AS, construido a partir de las concentraciones de Ang2 y de otras variables clínicas, puede mejorar sustancialmente la eficacia de los otros índices para la monitorización de la FH en pacientes con HCC, constituyendo por tanto una prueba diagnóstica potencialmente útil para el pronóstico y tratamiento de la enfermedad, siendo particularmente valiosa para descartar la existencia de fibrosis grave-(cirrosis) y detectar fibrosis inicial, lo que tiene importantes implicaciones en el seguimiento clínico de los pacientes con HCC.

Por último, las proteínas del VHC estarían creando un ambiente más favorable para la replicación y el establecimiento de la infección crónica al promover una notable alteración de la quiescencia vascular mediante la modulación diferencial de distintas vías de señalización celular que estimulan la síntesis de Ang2.

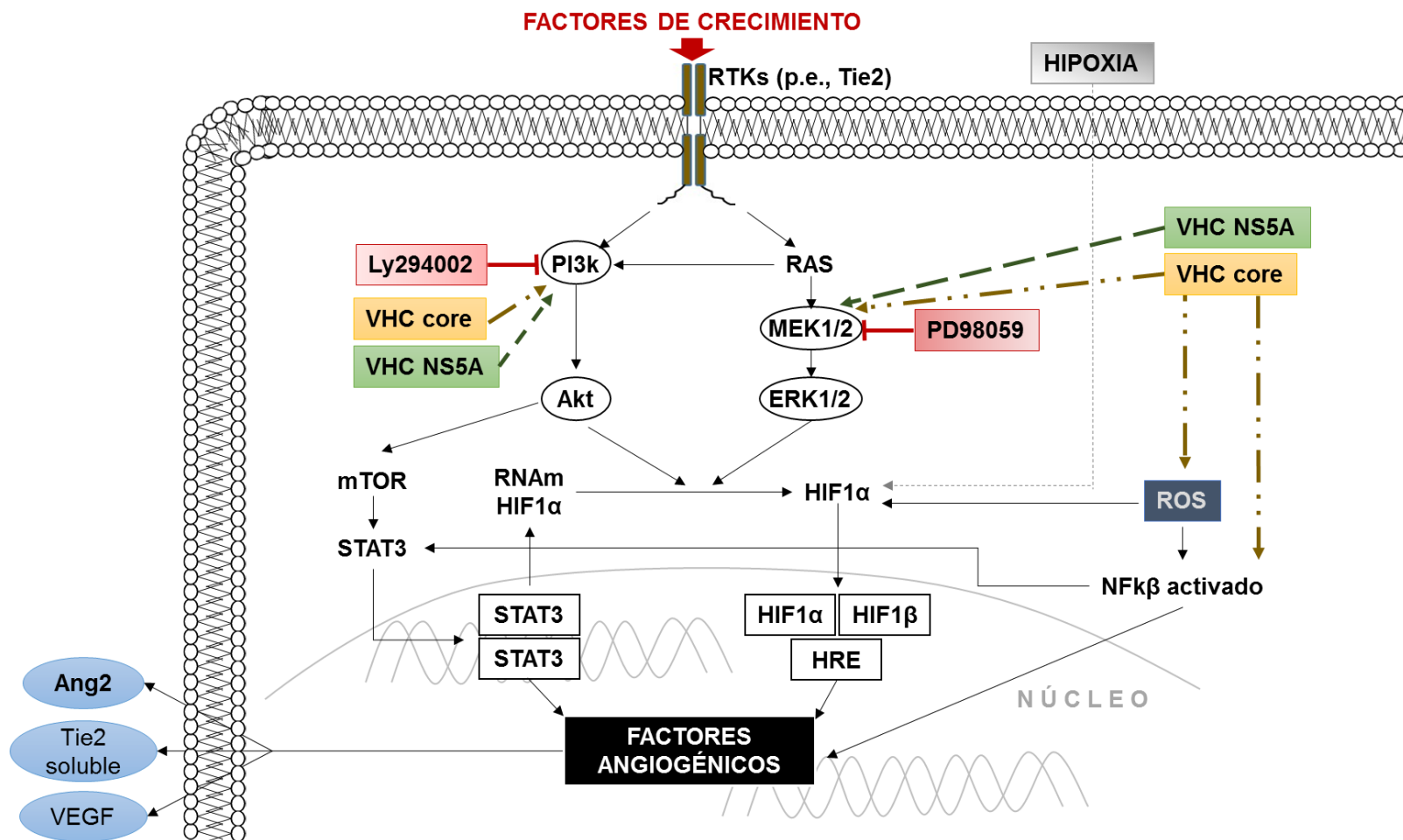


Figura 24. Esquema de la influencia de las proteínas del VHC en las vías de señalización PI3K y MEK/ERK.

Modificado de *Panteva M Col. Virus Research* 2003; 92:131-140.

---

---

## CONCLUSIONES

*“El tiempo es el mejor autor: siempre encuentra un final perfecto.”*

*Charles Chaplin (1889-1977).*

## VII. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. En el curso de la HCC existe un considerable desequilibrio de los niveles periféricos e intrahepáticos de Ang1 y Ang2 que refleja eficazmente la progresión de la enfermedad.
2. La determinación de Ang2, junto a otras variables clínicas y demográficas relacionadas, permitió desarrollar un nuevo índice para la evaluación precisa y no invasiva de la FH, AS, que mostró un margen de fiabilidad clínicamente efectivo para el diagnóstico de los distintos estadios de FH.
3. La eficacia AS para la estadificación de la FH fue significativamente superior al de otros índices de FH previamente descritos con los que fue comparado, aportando una mayor precisión para discriminar entre estadios de relevancia clínica como la ausencia de fibrosis significativa o la presencia de cirrosis.
4. El incremento de la síntesis de Ang2 en los hepatocitos infectados por el VHC podría alterar profundamente la quiescencia de la vasculatura intrahepática favoreciendo la progresión de la enfermedad. Por tanto, además del valor Ang2 como biomarcador de FH, la señalización mediada por el eje Angiopoyetinas/Tie2 puede constituir una valiosa diana de intervención terapéutica.

---

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*“Dejamos de temer aquello que se ha aprendido a entender.”*  
*Marie Curie (1867-1934).*

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244(4902):359-362.
2. Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42(4):962-973.
3. Lott WB, Takyar SS, Tuppen J, et al. Vitamin B12 and hepatitis C: molecular biology and human pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(9):4916-4921.
4. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. 2005;309(5734):623-626.
5. Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*. 2003;535(1-3):34-38.
6. Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol*. 2001;313(3):451-464.
7. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 7):1631-1648.
8. Bartenschlager R, Pietschmann T. Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(28):9739-9740.
9. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2334-2339.
10. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*. 2005;436(7053):933-938.
11. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(6):453-463.
12. Malcolm BA, Liu R, Lahser F, et al. SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and



- enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(3):1013-1020.
13. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, André P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol.* 2011;19(2):95-103.
14. Joyce MA, Tyrrell DL. The cell biology of hepatitis C virus. *Microbes Infect.* 2010;12(4):263-271.
15. Penin F, Brass V, Appel N, et al. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem.* 2004;279(39):40835-40843.
16. Massard J, Ratziu V, Thabut D, et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2006;44(1 Suppl):S19-24.
17. Rehmann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(3):215-229.
18. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet.* 1997;349(9055):825-832.
19. Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology.* 2006;43(6):1303-1310.
20. Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36(5 Suppl 1):S47-56.
21. Missiha SB, Ostrowski M, Heathcote EJ. Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiable factors. *Gastroenterology.* 2008;134(6):1699-1714.
22. Gremion C, Cerny A. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. *Rev Med Virol.* 2005;15(4):235-268.
23. De Nicola S, Aghemo A, Rumi MG, Colombo M. HCV genotype 3: an independent predictor of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2009;51(5):964-966.
24. Seeff LB. The history of the "natural history" of hepatitis C (1968-2009). *Liver Int.* 2009;29 Suppl 1:89-99.
25. Thomas DL, Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis.* 2005;9(3):383-398, vi.
26. Svrtlih N, Jevtovic D, Simonovic J, et al. Older age at the time of liver biopsy is the important risk factor for advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology.* 2007;54(80):2324-2327.

27. Di Martino V, Rufat P, Boyer N, et al. The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drug users: a long-term retrospective cohort study. *Hepatology*. 2001;34(6):1193-1199.
28. Sterling RK, Stravitz RT, Luketic VA, et al. A comparison of the spectrum of chronic hepatitis C virus between Caucasians and African Americans. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(6):469-473.
29. Ong JP, Younossi ZM, Speer C, Olano A, Gramlich T, Boparai N. Chronic hepatitis C and superimposed nonalcoholic fatty liver disease. *Liver*. 2001;21(4):266-271.
30. Alberti A, Benvegnù L. Management of hepatitis C. *J Hepatol*. 2003;38 Suppl 1:S104-118.
31. Berenguer M, Prieto M, Rayón JM, et al. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology*. 2000;32(4 Pt 1):852-858.
32. Zhang DY, Friedman SL. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2012;56(2):769-775.
33. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209-218.
34. Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(2):109-122.
35. Dalagiorgou G, Vassilaki N, Foka P, et al. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 6):1343-1351.
36. Medina J, Arroyo AG, Sánchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology*. 2004;39(5):1185-1195.
37. Dai CY, Chuang WL, Huang JF, Hsieh MY, Yu ML. Rapid virological response in hepatitis C virus genotype 1 and early ribavirin exposure. *Hepatology*. 2008;48(2):692-693; author reply 693-694.
38. Bertolotti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology*. 2003;38(1):4-13.
39. Ward S, Lauer G, Isba R, Walker B, Klenerman P. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clin Exp Immunol*. 2002;128(2):195-203.
40. Freeman AJ, Marinos G, French RA, Lloyd AR. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol*. 2001;79(6):515-536.

41. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med*. 2000;191(9):1499-1512.
42. Lai WK, Adams DH. Angiogenesis and chronic inflammation; the potential for novel therapeutic approaches in chronic liver disease. *J Hepatol*. 2005;42(1):7-11.
43. Bian XW, Chen JH, Jiang XF, Bai JS, Wang QL, Zhang X. Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(12):1537-1547.
44. Yanai H, Savitsky D, Tamura T, Taniguchi T. Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity: a current view. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(1):17-22.
45. Ramírez MJ, Titos E, Clària J, Navasa M, Fernández J, Rodés J. Increased apoptosis dependent on caspase-3 activity in polymorphonuclear leukocytes from patients with cirrhosis and ascites. *J Hepatol*. 2004;41(1):44-48.
46. Loo YM, Gale M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*. 2011;34(5):680-692.
47. Swiecki M, Wang Y, Vermi W, Gilfillan S, Schreiber RD, Colonna M. Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *J Exp Med*. 2011;208(12):2367-2374.
48. Takaki A, Tatsukawa M, Iwasaki Y, et al. Hepatitis C virus NS4 protein impairs the Th1 polarization of immature dendritic cells. *J Viral Hepat*. 2010;17(8):555-562.
49. Waggoner SN, Hall CH, Hahn YS. HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4+ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production. *J Leukoc Biol*. 2007;82(6):1407-1419.
50. Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(1):17-22.
51. Kato H, Sato S, Yoneyama M, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*. 2005;23(1):19-28.
52. Shaw S, Luce GE. The lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 and CD2/LFA-3 pathways of antigen-independent human T cell adhesion. *J Immunol*. 1987;139(4):1037-1045.
53. Arenson EB, Epstein MB, Seeger RC. Volumetric and functional heterogeneity of human monocytes. *J Clin Invest*. 1980;65(3):613-618.

54. Dolganiuc A, Szabo G. T cells with regulatory activity in hepatitis C virus infection: what we know and what we don't. *J Leukoc Biol.* 2008;84(3):614-622.
55. Li Y, Zhang T, Ho C, Orange JS, Douglas SD, Ho WZ. Natural killer cells inhibit hepatitis C virus expression. *J Leukoc Biol.* 2004;76(6):1171-1179.
56. Wilson SB, Delovitch TL. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(3):211-222.
57. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2001;194(10):1395-1406.
58. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15661-15668.
59. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15669-15674.
60. Czaja MJ. TNF toxicity--death from caspase or cathepsin, that is the question. *Hepatology.* 2001;34(4 Pt 1):844-846.
61. Maher JJ. Rat hepatocytes and Kupffer cells interact to produce interleukin-8 (CINC) in the setting of ethanol. *Am J Physiol.* 1995;269(4 Pt 1):G518-523.
62. Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology.* 2008;47(1):321-331.
63. Rehmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest.* 2009;119(7):1745-1754.
64. Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today.* 1996;17(5):217-224.
65. Cox AL, Mosbruger T, Mao Q, et al. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med.* 2005;201(11):1741-1752.
66. Fuller MJ, Shoukry NH, Gushima T, et al. Selection-driven immune escape is not a significant factor in the failure of CD4 T cell responses in persistent hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2010;51(2):378-387.
67. Penna A, Pilli M, Zerbini A, et al. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2007;45(3):588-601.
68. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, et al. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science.* 1992;258(5079):135-140.

69. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655-1669.
70. Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc*. 2004;37(1):3-15.
71. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol*. 2007;6:7.
72. Jiao J, Friedman SL, Aloman C. Hepatic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009;25(3):223-229.
73. Planagumà A, Clària J, Miquel R, et al. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation. *FASEB J*. 2005;19(9):1120-1122.
74. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*. 2000;275(4):2247-2250.
75. Aghemo A, Colombo M. Cirrhosis regression in chronic hepatitis C: an old tale with a new ending. *Gastroenterology*. 2009;136(4):1447-1449.
76. Zois CD, Baltayiannis GH, Karayiannis P, Tsianos EV. Systematic review: hepatic fibrosis - regression with therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(10):1175-1187.
77. McCuskey RS. The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008;291(6):661-671.
78. Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis*. 2008;12(4):861-882, x.
79. Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999;14(7):618-633.
80. Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, et al. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem*. 2001;276(13):9945-9954.
81. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008;88(1):125-172.
82. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214(2):199-210.

83. Brenner DA. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2009;120:361-368.
84. Gentilini A, Marra F, Gentilini P, Pinzani M. Phosphatidylinositol-3 kinase and extracellular signal-regulated kinase mediate the chemotactic and mitogenic effects of insulin-like growth factor-I in human hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2000;32(2):227-234.
85. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology.* 2002;35(5):1010-1021.
86. Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, et al. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2005;42(6):1339-1348.
87. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005;438(7070):932-936.
88. García-Monzón C, Sánchez-Madrid F, García-Buey L, García-Arroyo A, García-Sánchez A, Moreno-Otero R. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology.* 1995;108(1):231-241.
89. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(1):4-6.
90. Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol.* 2009;50(3):604-620.
91. Valfrè di Bonzo L, Novo E, Cannito S, et al. Angiogenesis and liver fibrogenesis. *Histol Histopathol.* 2009;24(10):1323-1341.
92. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6(4):389-395.
93. Chaparro M, Sanz-Cameno P, Trapero-Marugan M, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Mechanisms of angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Ann Hepatol.* 2007;6(4):208-213.
94. Semela D, Dufour JF. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2004;41(5):864-880.
95. Medina J, Sanz-Cameno P, García-Buey L, Martín-Vílchez S, López-Cabrera M, Moreno-Otero R. Evidence of angiogenesis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical descriptive study. *J Hepatol.* 2005;42(1):124-131.

96. Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J Hepatol.* 2010;53(5):976-980.
97. Felmeden DC, Blann AD, Lip GY. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur Heart J.* 2003;24(7):586-603.
98. Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer.* 2000;36(13 Spec No):1649-1660.
99. Déry MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(3):535-540.
100. Bonello S, Zähringer C, BelAiba RS, et al. Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(4):755-761.
101. Imhof BA, Aurrand-Lions M. Angiogenesis and inflammation face off. *Nat Med.* 2006;12(2):171-172.
102. Ko HM, Seo KH, Han SJ, et al. Nuclear factor kappaB dependency of platelet-activating factor-induced angiogenesis. *Cancer Res.* 2002;62(6):1809-1814.
103. Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 2000;60(6):1541-1545.
104. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(6):425-437.
105. Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22(4):395-403.
106. Huang Y, Li S. Detection of characteristic sub pathway network for angiogenesis based on the comprehensive pathway network. *BMC Bioinformatics.* 2010;11 Suppl 1:S32.
107. McCuskey RS, Reilly FD. Hepatic microvasculature: dynamic structure and its regulation. *Semin Liver Dis.* 1993;13(1):1-12.
108. Camenisch G, Pisabarro MT, Sherman D, et al. ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin alpha vbeta 3 and induces blood vessel formation in vivo. *J Biol Chem.* 2002;277(19):17281-17290.
109. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9(6):653-660.

110. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol.* 2006;72(11):1605-1621.
111. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
112. Gong R, Rifai A, Dworkin LD. Anti-inflammatory effect of hepatocyte growth factor in chronic kidney disease: targeting the inflamed vascular endothelium. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(9):2464-2473.
113. Funai K, Uramoto H. Regulatory mechanisms for the expression and activity of platelet-derived growth factor receptor. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(3):647-658.
114. Lee YC. The involvement of VEGF in endothelial permeability: a target for anti-inflammatory therapy. *Curr Opin Investig Drugs.* 2005;6(11):1124-1130.
115. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 2003;161(6):1163-1177.
116. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407(6801):249-257.
117. Gamble JR, Drew J, Trezise L, et al. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res.* 2000;87(7):603-607.
118. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med.* 2006;12(2):235-239.
119. Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 4):771-780.
120. Mazzanti R, Messerini L, Monsacchi L, et al. Chronic viral hepatitis induced by hepatitis C but not hepatitis B virus infection correlates with increased liver angiogenesis. *Hepatology.* 1997;25(1):229-234.
121. Ohmori S, Shiraki K, Sugimoto K, et al. High expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with HCV-associated chronic liver diseases. *Hum Pathol.* 2001;32(12):1363-1370.
122. Salcedo Mora X, Sanz-Cameno P, Medina J, et al. Association between angiogenesis soluble factors and disease progression markers in chronic hepatitis C patients. *Rev Esp Enferm Dig.* 2005;97(10):699-706.



123. Kukla M, Zwirska-Korczala K, Gabriel A, et al. sPECAM-1 and sVCAM-1: Role in Pathogenesis and Diagnosis of Chronic Hepatitis C and Association with Response to Antiviral Therapy. *Therap Adv Gastroenterol*. 2009;2(2):79-90.
124. Gabriel A, Kukla M, Wilk M, Liszka Ł, Petelenz M, Musialik J. Angiogenesis in chronic hepatitis C is associated with inflammatory activity grade and fibrosis stage. *Pathol Res Pract*. 2009;205(11):758-764.
125. Salcedo X, Medina J, Sanz-Cameno P, et al. The potential of angiogenesis soluble markers in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2005;42(3):696-701.
126. Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol*. 2006;27(12):552-558.
127. Tanaka S, Sugimachi K, Yamashita Y, Shirabe K, Shimada M, Wands JR. Angiogenic switch as a molecular target of malignant tumors. *J Gastroenterol*. 2003;38 Suppl 15:93-97.
128. Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res*. 2006;312(5):630-641.
129. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(3):165-177.
130. London NR, Smith MC, Li DY. Emerging mechanisms of vascular stabilization. *J Thromb Haemost*. 2009;7 Suppl 1:57-60.
131. Jones N, Chen SH, Sturk C, et al. A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function. *Mol Cell Biol*. 2003;23(8):2658-2668.
132. Hughes DP, Marron MB, Brindle NP. The antiinflammatory endothelial tyrosine kinase Tie2 interacts with a novel nuclear factor-kappaB inhibitor ABIN-2. *Circ Res*. 2003;92(6):630-636.
133. Jones N, Ijijn K, Dumont DJ, Alitalo K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(4):257-267.
134. Sugimachi K, Tanaka S, Taguchi K, Aishima S, Shimada M, Tsuneyoshi M. Angiopoietin switching regulates angiogenesis and progression of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol*. 2003;56(11):854-860.
135. Makinde TO, Agrawal DK. Increased expression of angiopoietins and Tie2 in the lungs of chronic asthmatic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(3):384-393.

136. Scholz A, Lang V, Henschler R, et al. Angiopoietin-2 promotes myeloid cell infiltration in a  $\beta_2$ -integrin-dependent manner. *Blood*. 2011;118(18):5050-5059.
137. Kim H, Koh GY. Ang2, the instigator of inflammation. *Blood*. 2011;118(18):4767-4768.
138. Sanz-Cameno P, Martín-Vílchez S, Lara-Pezzi E, et al. Hepatitis B virus promotes angiopoietin-2 expression in liver tissue: role of HBV x protein. *Am J Pathol*. 2006;169(4):1215-1222.
139. Ker CG, Chen HY, Juan CC, et al. Role of angiogenesis in hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 1999;46(26):646-650.
140. Medina J, Caveda L, Sanz-Cameno P, et al. Hepatocyte growth factor activates endothelial proangiogenic mechanisms relevant in chronic hepatitis C-associated neoangiogenesis. *J Hepatol*. 2003;38(5):660-667.
141. Daly C, Pasnikowski E, Burova E, et al. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(42):15491-15496.
142. Lind AJ, Wikström P, Granfors T, Egevad L, Stattin P, Bergh A. Angiopoietin 2 expression is related to histological grade, vascular density, metastases, and outcome in prostate cancer. *Prostate*. 2005;62(4):394-399.
143. Tanaka H, Yamamoto M, Hashimoto N, et al. Hypoxia-independent overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha as an early change in mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*. 2006;66(23):11263-11270.
144. Salcedo X, Medina J, Sanz-Cameno P, García-Buey L, Martín-Vílchez S, Moreno-Otero R. Review article: angiogenesis soluble factors as liver disease markers. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22(1):23-30.
145. Vespasiani-Gentilucci U, Galati G, Mazzarelli C, et al. Angiogenic cytokines in patients undergoing antiviral treatment for chronic hepatitis C virus infection. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31(2):207-210.
146. Gretton S, Hughes M, Harris M. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by Ras-Erk signalling. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 3):671-680.
147. Yokoyama H, Hirose H, Ohgo H, Saito I. Inverse association between serum adiponectin level and transaminase activities in Japanese male workers. *J Hepatol*. 2004;41(1):19-24.
148. Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, et al. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol*. 2002;76(10):5062-5070.

149. Wang JH, Layden TJ, Eckels DD. Modulation of the peripheral T-Cell response by CD4 mutants of hepatitis C virus: transition from a Th1 to a Th2 response. *Hum Immunol.* 2003;64(7):662-673.
150. Hosomura N, Kono H, Tsuchiya M, et al. HCV-related proteins activate Kupffer cells isolated from human liver tissues. *Dig Dis Sci.* 2011;56(4):1057-1064.
151. Bala S, Tilahun Y, Taha O, et al. Increased microRNA-155 expression in the serum and peripheral monocytes in chronic HCV infection. *J Transl Med.* 2012;10:151.
152. Núñez O, Fernández-Martínez A, Majano PL, et al. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut.* 2004;53(11):1665-1672.
153. Valgimigli M, Valgimigli L, Trerè D, et al. Oxidative stress EPR measurement in human liver by radical-probe technique. Correlation with etiology, histology and cell proliferation. *Free Radic Res.* 2002;36(9):939-948.
154. Tien Kuo M, Savaraj N. Roles of reactive oxygen species in hepatocarcinogenesis and drug resistance gene expression in liver cancers. *Mol Carcinog.* 2006;45(9):701-709.
155. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002;192(1):1-15.
156. Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene.* 2010;29(16):2309-2324.
157. Ivanov AV, Smirnova OA, Ivanova ON, Masalova OV, Kochetkov SN, Isaguliant MG. Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells. *PLoS One.* 2011;6(9):e24957.
158. Piccoli C, Scrima R, Quarato G, et al. Hepatitis C virus protein expression causes calcium-mediated mitochondrial bioenergetic dysfunction and nitro-oxidative stress. *Hepatology.* 2007;46(1):58-65.
159. Ming-Ju H, Yih-Shou H, Tzy-Yen C, Hui-Ling C. Hepatitis C virus E2 protein induce reactive oxygen species (ROS)-related fibrogenesis in the HSC-T6 hepatic stellate cell line. *J Cell Biochem.* 2011;112(1):233-243.
160. Pal S, Polyak SJ, Bano N, et al. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25(3):627-634.

161. Li S, Ye L, Yu X, et al. Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF-kappaB activation. *Virology*. 2009;391(2):257-264.
162. Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(17):9599-9604.
163. Choi J, Forman HJ, Ou JH, Lai MM, Seronello S, Nandipati A. Redox modulation of the hepatitis C virus replication complex is calcium dependent. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(9):1488-1498.
164. Matsuzaki K, Murata M, Yoshida K, et al. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007;46(1):48-57.
165. Hassan M, Selimovic D, Ghozlan H, Abdel-kader O. Hepatitis C virus core protein triggers hepatic angiogenesis by a mechanism including multiple pathways. *Hepatology*. 2009;49(5):1469-1482.
166. Mazzocca A, Sciammetta SC, Carloni V, et al. Binding of hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 up-regulates matrix metalloproteinase-2 in human hepatic stellate cells. *J Biol Chem*. 2005;280(12):11329-11339.
167. Douam F, Dao Thi VL, Maurin G, et al. Critical interaction between E1 and E2 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell entry. *Hepatology*. 2014;59(3):776-788.
168. Nasimuzzaman M, Waris G, Mikolon D, Stupack DG, Siddiqui A. Hepatitis C virus stabilizes hypoxia-inducible factor 1alpha and stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor. *J Virol*. 2007;81(19):10249-10257.
169. Li W, Liang X, Kellendonk C, Poli V, Taub R. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem*. 2002;277(32):28411-28417.
170. Jahan S, Khaliq S, Ijaz B, Ahmad W, Hassan S. Role of HCV Core gene of genotype 1a and 3a and host gene Cox-2 in HCV-induced pathogenesis. *Virology*. 2011;8:155.
171. Mazurek A, Pierzyński P, Kuć P, et al. Evaluation of angiogenesis, p-53 tissue protein expression and serum VEGF in patients with endometrial cancer. *Neoplasma*. 2004;51(3):193-197.

172. Holland CM, Day K, Evans A, Smith SK. Expression of the VEGF and angiopoietin genes in endometrial atypical hyperplasia and endometrial cancer. *Br J Cancer*. 2003;89(5):891-898.
173. Suzuki H, Mori M, Kawaguchi C, Adachi M, Miura S, Ishii H. Serum vascular endothelial growth factor in the course of transcatheter arterial embolization of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 1999;14(6):1087-1090.
174. Tanaka S, Sugimachi K, Yamashita Y, et al. Tie2 vascular endothelial receptor expression and function in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2002;35(4):861-867.
175. Mitsuhashi N, Shimizu H, Ohtsuka M, et al. Angiopoietins and Tie-2 expression in angiogenesis and proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2003;37(5):1105-1113.
176. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2001;345(1):41-52.
177. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, Diseases AAftSoL. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009;49(4):1335-1374.
178. Ahmad W, Ijaz B, Gull S, et al. A brief review on molecular, genetic and imaging techniques for HCV fibrosis evaluation. *Virol J*. 2011;8:53.
179. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD, Diseases AAftSoL. Liver biopsy. *Hepatology*. 2009;49(3):1017-1044.
180. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet*. 2003;362(9401):2095-2100.
181. Saadeh S, Cammell G, Carey WD, Younossi Z, Barnes D, Easley K. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2001;33(1):196-200.
182. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24(2):289-293.
183. Mendoza J, Gómez-Domínguez E, Moreno-Otero R. [Transient elastography (Fibroscan), a new non-invasive method to evaluate hepatic fibrosis]. *Med Clin (Barc)*. 2006;126(6):220-222.
184. Muir AJ, Trotter JF. A survey of current liver biopsy practice patterns. *J Clin Gastroenterol*. 2002;35(1):86-88.
185. Bedossa P, Dargère D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(6):1449-1457.

186. Guido M, Rugge M. Liver biopsy sampling in chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis.* 2004;24(1):89-97.
187. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1994;20(1 Pt 1):15-20.
188. Dienstag JL. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36(5 Suppl 1):S152-160.
189. Standish RA, Cholongitas E, Dhillon A, Burroughs AK, Dhillon AP. An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut.* 2006;55(4):569-578.
190. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):47-55.
191. Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology.* 2008;134(6):1670-1681.
192. Pinzani M, Vizzutti F, Arena U, Marra F. Technology Insight: noninvasive assessment of liver fibrosis by biochemical scores and elastography. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2008;5(2):95-106.
193. Bonino F, Arena U, Brunetto MR, et al. Liver stiffness, a non-invasive marker of liver disease: a core study group report. *Antivir Ther.* 2010;15 Suppl 3:69-78.
194. Zhou K, Lu LG. Assessment of fibrosis in chronic liver diseases. *J Dig Dis.* 2009;10(1):7-14.
195. Kelleher TB, Afdhal N. Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Clin Liver Dis.* 2005;9(4):667-683, vii.
196. Pinzani M, Rombouts K, Colagrande S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *J Hepatol.* 2005;42 Suppl(1):S22-36.
197. Baranova A, Lal P, Biredinc A, Younossi ZM. Non-invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterol.* 2011;11:91.
198. Murawaki Y, Ikuta Y, Nishimura Y, Koda M, Kawasaki H. Serum markers for fibrosis and plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma in comparison with patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 1996;11(5):443-450.
199. Guéchet J, Laudat A, Loria A, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem.* 1996;42(4):558-563.

200. McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, et al. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15(8):945-951.
201. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2005;25(4):779-786.
202. Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(6):1160-1174.
203. Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta*. 2002;316(1-2):71-81.
204. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, et al. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*. 2004;41(6):935-942.
205. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518-526.
206. Calès P, Oberti F, Michalak S, et al. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology*. 2005;42(6):1373-1381.
207. Akobeng AK. Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatr*. 2007;96(3):338-341.
208. Poynard T, Ngo Y, Munteanu M, et al. Biomarkers of liver injury for hepatitis clinical trials: a meta-analysis of longitudinal studies. *Antivir Ther*. 2010;15(4):617-631.
209. Imbert-Bismut F, Ratzu V, Pieroni L, et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet*. 2001;357(9262):1069-1075.
210. Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*. 2002;36(4 Pt 1):986-992.
211. Parise ER, Oliveira AC, Figueiredo-Mendes C, et al. Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C virus infection. *Liver Int*. 2006;26(9):1095-1099.

212. Boursier J, de Ledinghen V, Zarski JP, et al. Comparison of eight diagnostic algorithms for liver fibrosis in hepatitis C: new algorithms are more precise and entirely noninvasive. *Hepatology*. 2012;55(1):58-67.
213. Carrión JA. [Utility of Fibroscan in the evaluation of liver fibrosis]. *Gastroenterol Hepatol*. 2009;32(6):415-423.
214. Cebbold JF, Morin S, Taylor-Robinson SD. Transient elastography for the assessment of chronic liver disease: ready for the clinic? *World J Gastroenterol*. 2007;13(36):4791-4797.
215. Colletta C, Smirne C, Fabris C, et al. Value of two noninvasive methods to detect progression of fibrosis among HCV carriers with normal aminotransferases. *Hepatology*. 2005;42(4):838-845.
216. Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2005;41(1):48-54.
217. Vergniol J, Foucher J, Mamou K, et al. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using FibroScan in long-term sustained-virological responder patients after HCV treatment. *Gastroenterol Clin Biol*. 2008;32(12):1061-1063.
218. Kawamoto M, Mizuguchi T, Katsuramaki T, et al. Assessment of liver fibrosis by a noninvasive method of transient elastography and biochemical markers. *World J Gastroenterol*. 2006;12(27):4325-4330.
219. Poynard T, Morra R, Halfon P, et al. Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease. *BMC Gastroenterol*. 2007;7:40.
220. Kamphues C, Lotz K, Röcken C, et al. Chances and limitations of non-invasive tests in the assessment of liver fibrosis in liver transplant patients. *Clin Transplant*. 2010;24(5):652-659.
221. Maor Y, Halfon P, Bashari D, et al. Fibrotest or Fibroscan for evaluation of liver fibrosis in haemophilia patients infected with hepatitis C. *Haemophilia*. 2010;16(1):148-154.
222. Sagir A, Erhardt A, Schmitt M, Häussinger D. Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage. *Hepatology*. 2008;47(2):592-595.
223. Foucher J, Castéra L, Bernard PH, et al. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18(4):411-412.



- 224. Lebray P, Varnous S, Charlotte F, Varaut A, Poynard T, Ratzu V. Liver stiffness is an unreliable marker of liver fibrosis in patients with cardiac insufficiency. *Hepatology*. 2008;48(6):2089.
- 225. Millonig G, Reimann FM, Friedrich S, et al. Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis. *Hepatology*. 2008;48(5):1718-1723.
- 226. Castéra L, Vergniol J, Foucher J, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005;128(2):343-350.
- 227. Parkes J, Guha IN, Roderick P, Rosenberg W. Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2006;44(3):462-474.
- 228. Fluss R, Faraggi D, Reiser B. Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point. *Biom J*. 2005;47(4):458-472.
- 229. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43(6):1317-1325.
- 230. Cross TJ, Rizzi P, Berry PA, Bruce M, Portmann B, Harrison PM. King's Score: an accurate marker of cirrhosis in chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21(7):730-738.
- 231. Williams AL, Hoofnagle JH. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis. *Gastroenterology*. 1988;95(3):734-739.
- 232. Westin J, Ydreborg M, Islam S, et al. A non-invasive fibrosis score predicts treatment outcome in chronic hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol*. 2008;43(1):73-80.
- 233. Lok AS, Ghany MG, Goodman ZD, et al. Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: results of the HALT-C cohort. *Hepatology*. 2005;42(2):282-292.
- 234. Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y. FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2007;45(2):297-306.
- 235. Ahmad W, Ijaz B, Javed FT, et al. A comparison of four fibrosis indexes in chronic HCV: development of new fibrosis-cirrhosis index (FCI). *BMC Gastroenterol*. 2011;11:44.

236. Hernández-Bartolomé A, López-Rodríguez R, Rodríguez-Muñoz Y, et al. Angiopoietin-2 Serum Levels Improve Noninvasive Fibrosis Staging in Chronic Hepatitis C: A Fibrogenic-Angiogenic Link. *PLoS One*. 2013;8(6):e66143.
237. Pauta M, Ribera J, Melgar-Lesmes P, et al. Overexpression of angiopoietin-2 in rats and patients with liver fibrosis. Therapeutic consequences of its inhibition. *Liver Int*. 2014.
238. Scholz A, Rehm VA, Rieke S, et al. Angiopoietin-2 serum levels are elevated in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(11):2471-2481.
239. Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. *Lancet*. 2008;372(9635):321-332.
240. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001;21(3):397-416.
241. Costantini S, Capone F, Maio P, et al. Cancer biomarker profiling in patients with chronic hepatitis C virus, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2013;29(6):2163-2168.
242. Ciupińska-Kajor M, Hartleb M, Kajor M, et al. Hepatic angiogenesis and fibrosis are common features in morbidly obese patients. *Hepatol Int*. 2013;7(1):233-240.
243. Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y, Makuuchi M, Sugimachi K, Wands JR. Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest*. 1999;103(3):341-345.
244. Zhao ZC, Zheng SS, Wan YL, et al. [The effect of pro-angiogenic factors and their receptors on angiogenesis in hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2004;26(8):472-475.
245. Currie MJ, Gunningham SP, Turner K, et al. Expression of the angiopoietins and their receptor Tie2 in human renal clear cell carcinomas; regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia. *J Pathol*. 2002;198(4):502-510.
246. Etoh T, Inoue H, Tanaka S, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Res*. 2001;61(5):2145-2153.
247. Amarapurkar AD, Amarapurkar DN, Vibhav S, Patel ND. Angiogenesis in chronic liver disease. *Ann Hepatol*. 2007;6(3):170-173.
248. Fernández-Rodríguez CM, Gutiérrez ML, Serrano PL, et al. Factors influencing the rate of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*. 2004;49(11-12):1971-1976.

249. Bonacini M, Hadi G, Govindarajan S, Lindsay KL. Utility of a discriminant score for diagnosing advanced fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol*. 1997;92(8):1302-1304.
250. Kamimoto Y, Horiuchi S, Tanase S, Morino Y. Plasma clearance of intravenously injected aspartate aminotransferase isozymes: evidence for preferential uptake by sinusoidal liver cells. *Hepatology*. 1985;5(3):367-375.
251. Nalpas B, Vassault A, Le Guillou A, et al. Serum activity of mitochondrial aspartate aminotransferase: a sensitive marker of alcoholism with or without alcoholic hepatitis. *Hepatology*. 1984;4(5):893-896.
252. Bonnard P, Elsharkawy A, Zalata K, et al. Comparison of liver biopsy and noninvasive techniques for liver fibrosis assessment in patients infected with HCV-genotype 4 in Egypt. *J Viral Hepat*. 2014.
253. Boursier J, Brochard C, Bertrais S, et al. Combination of blood tests for significant fibrosis and cirrhosis improves the assessment of liver-prognosis in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(2):178-188.
254. Guéchet J, Boisson RC, Zarski JP, et al. AST/ALT ratio is not an index of liver fibrosis in chronic hepatitis C when aminotransferase activities are determinate according to the international recommendations. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013;37(5):467-472.
255. Poynard T, Vergniol J, Ngo Y, et al. Staging chronic hepatitis C in seven categories using fibrosis biomarker (FibroTest™) and transient elastography (FibroScan®). *J Hepatol*. 2014;60(4):706-714.
256. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol*. 2003;29(12):1705-1713.
257. Kasztelan-Szczerbinska B, Surdacka A, Slomka M, et al. Angiogenesis-related biomarkers in patients with alcoholic liver disease: their association with liver disease complications and outcome. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:673032.
258. Okuda M, Li K, Beard MR, et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*. 2002;122(2):366-375.
259. Fukuhara T, Takeishi K, Toshima T, et al. Impact of amino acid substitutions in the core region of HCV on multistep hepatocarcinogenesis. *Hepatol Res*. 2010;40(2):171-178.

260. Nanda SK, Herion D, Liang TJ. The SH3 binding motif of HCV [corrected] NS5A protein interacts with Bin1 and is important for apoptosis and infectivity. *Gastroenterology*. 2006;130(3):794-809.
261. Milward A, Mankouri J, Harris M. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with beta-catenin and stimulates its transcriptional activity in a phosphoinositide-3 kinase-dependent fashion. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 2):373-381.
262. Kanda T, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus core protein augments androgen receptor-mediated signaling. *J Virol*. 2008;82(22):11066-11072.
263. Muñoz-Chápuli R, Quesada AR, Angel Medina M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(17):2224-2243.
264. Kang Z, Zhu H, Jiang W, Zhang S. Protocatechuic acid induces angiogenesis through PI3K-Akt-eNOS-VEGF signalling pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013;113(4):221-227.
265. Michl P, Downward J. Mechanisms of disease: PI3K/AKT signaling in gastrointestinal cancers. *Z Gastroenterol*. 2005;43(10):1133-1139.
266. Li B, Li X, Li Y, et al. The effects of hepatitis C virus non-structural protein 3 on cell growth mediated by extracellular signal-related kinase cascades in human hepatocytes in vitro. *Int J Mol Med*. 2010;26(2):273-279.
267. Mankouri J, Griffin S, Harris M. The hepatitis C virus non-structural protein NS5A alters the trafficking profile of the epidermal growth factor receptor. *Traffic*. 2008;9(9):1497-1509.
268. Macdonald A, Mazaleyrat S, McCormick C, et al. Further studies on hepatitis C virus NS5A-SH3 domain interactions: identification of residues critical for binding and implications for viral RNA replication and modulation of cell signalling. *J Gen Virol*. 2005;86(Pt 4):1035-1044.

---

---

## ANEXOS

*“El mundo real es mucho más pequeño que el mundo de la imaginación.”*  
*Friedrich Wilhelm Nietzsche (1844-1900).*

## IX. ANEXOS

### Anexo I. Esquema de los replicones del VHC

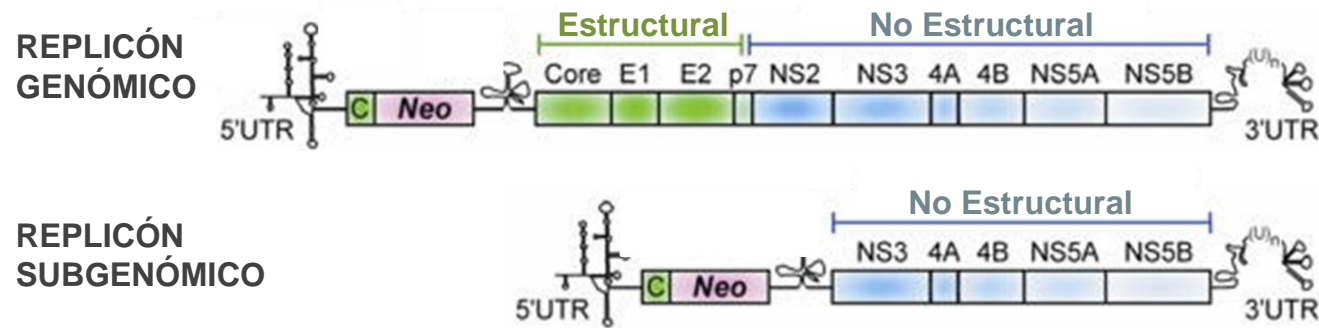


Diagrama de replicones genómicos y subgenómicos del VHC, capaces de amplificarse de forma autónoma cuando son transfectados en células Huh7.

## Anexo II. Comparación entre diferentes índices diagnósticos de FH en el total de pacientes HCC.

F>1															
	AUC-ROC	Cutoff	S (%)	IC	E (%)	IC	RPP (%)	IC	RPN (%)	IC	VPP (%)	IC	VPN (%)	IC	PPD (%)
<b>AS<sup>1</sup></b>	0.886 (0.829-0.928)	>1.9248	79.41	71.6 - 85.9	83.33	68.6 - 93.0	4.76	2.4 - 9.4	0.25	0.2 - 0.4	81.5	71.4 - 89.2	81.4	72.1 - 88.7	<b>81.5</b>
<b>AS<sup>2</sup></b>	0.886 (0.829-0.928)	>1.9248	79.41	71.6 - 85.9	83.33	68.6 - 93.0	4.76	2.4 - 9.4	0.25	0.2 - 0.4	81.5	71.4 - 89.2	81.4	72.1 - 88.7	<b>81.5</b>
<b>AS<sup>3</sup></b>	0.886 (0.829-0.928)	>1.5848	90.44	84.2 - 94.8	64.29	48.0 - 78.4	2.53	2.0 - 3.2	0.15	0.08 - 0.3	70.0	60.6 - 78.4	87.9	77.7 - 94.6	<b>76.8</b>
<b>AS<sup>4</sup></b>	0.886 (0.829-0.928)	>2.1906	61.03	52.3 - 69.3	90.48	77.4 - 97.3	6.41	2.5 - 16.4	0.43	0.3 - 0.5	85.5	74.1 - 93.3	71.6	62.5 - 79.5	<b>76.3</b>
<b>APRI<sup>1</sup></b>	0.822 (0.758-0.875)	>0.7158	58.09	49.3 - 66.5	90.48	77.4 - 97.3	6.10	2.4 - 15.7	0.46	0.4 - 0.6	84.9	73.1 - 93.0	70.0	61.0 - 78.1	<b>74.9</b>
<b>APRI<sup>2</sup></b>	0.822 (0.758-0.875)	>0.7158	58.09	49.3 - 66.5	90.48	77.4 - 97.3	6.10	2.4 - 15.7	0.46	0.4 - 0.6	84.9	73.1 - 93.0	70.0	61.0 - 78.1	<b>74.9</b>
<b>APRI<sup>3</sup></b>	0.822 (0.758-0.875)	>0.3938	90.44	84.2 - 94.8	57.14	41.0 - 72.3	2.11	1.5 - 3.0	0.17	0.09 - 0.3	66.1	56.7 - 74.6	86.6	75.5 - 94.0	<b>73.1</b>
<b>APRI<sup>4</sup></b>	0.822 (0.758-0.875)	>0.7158	58.09	49.3 - 66.5	90.48	77.4 - 97.3	6.10	2.4 - 15.7	0.46	0.4 - 0.6	84.9	73.1 - 93.0	70.0	61.0 - 78.1	<b>74.9</b>
<b>FIB4<sup>1</sup></b>	0.855 (0.795-0.903)	>1.2030	72.06	63.7 - 79.4	83.33	68.6 - 93.0	4.32	2.2 - 8.6	0.34	0.2 - 0.5	80.0	69.2 - 88.3	76.4	66.9 - 84.3	<b>77.9</b>
<b>FIB4<sup>2</sup></b>	0.855 (0.795-0.903)	>1.3524	64.71	56.1 - 72.7	90.48	77.4 - 97.3	6.79	2.7 - 17.4	0.39	0.3 - 0.5	86.2	75.3 - 93.6	73.5	64.4 - 81.4	<b>78.1</b>
<b>FIB4<sup>3</sup></b>	0.855 (0.795-0.903)	>0.8629	90.44	84.2 - 94.8	57.14	41.0 - 72.3	2.11	1.5 - 3.0	0.17	0.09 - 0.3	66.1	56.7 - 74.6	86.6	75.5 - 94.0	<b>73.1</b>
<b>FIB4<sup>4</sup></b>	0.855 (0.795-0.903)	>1.3524	64.71	56.1 - 72.7	90.48	77.4 - 97.3	6.79	2.7 - 17.4	0.39	0.3 - 0.5	86.2	75.3 - 93.6	73.5	64.4 - 81.4	<b>78.1</b>
<b>KING<sup>1</sup></b>	0.855 (0.795-0.903)	>10.647	72.06	63.7 - 79.4	85.71	71.5 - 94.6	5.04	2.4 - 10.7	0.33	0.2 - 0.4	82.3	71.7 - 90.2	76.9	67.5 - 84.6	<b>79.2</b>
<b>KING<sup>2</sup></b>	0.855 (0.795-0.903)	>10.647	72.06	63.7 - 79.4	85.71	71.5 - 94.6	5.04	2.4 - 10.7	0.33	0.2 - 0.4	82.3	71.7 - 90.2	76.9	67.5 - 84.6	<b>79.2</b>

<b>KING<sup>3</sup></b>	0.855 (0.795-0.903)	>6.9232	90.44	84.2 - 94.8	59.52	43.3 - 74.4	2.23	1.5 - 3.2	0.16	0.09 - 0.3	67.3	57.9 - 75.8	87.1	76.2 - 94.2	<b>74.4</b>
<b>KING<sup>4</sup></b>	0.855 (0.795-0.903)	>12.8571	61.03	52.3 - 69.3	90.48	77.4 - 97.3	6.41	2.5 - 16.4	0.43	0.3 - 0.5	85.5	74.1 - 93.3	71.6	62.5 - 79.5	<b>76.3</b>
<b>AAR<sup>1</sup></b>	0.554 (0.447-0.628)	>0.6486	54.01	45.3 - 62.6	61.9	45.6 - 76.4	1.42	0.9 - 2.1	0.74	0.6 - 1.0	56.7	45.2 - 67.7	59.3	48.9 - 69.2	<b>58.1</b>
<b>AAR<sup>2</sup></b>	0.554 (0.447-0.628)	>0.6486	54.01	45.3 - 62.6	61.9	45.6 - 76.4	1.42	0.9 - 2.1	0.74	0.6 - 1.0	56.7	45.2 - 67.7	59.3	48.9 - 69.2	<b>58.1</b>
<b>AAR<sup>3</sup></b>	0.554 (0.447-0.628)	>0.4538	90.51	84.3 - 94.9	11.9	4.0 - 25.6	1.03	0.9 - 1.2	0.80	0.3 - 2.1	48.7	40.7 - 56.7	57.6	33.2 - 79.5	<b>49.6</b>
<b>AAR<sup>4</sup></b>	0.554 (0.447-0.628)	>1.0000	8.03	4.1 - 13.9	92.86	80.5 - 98.5	1.12	0.3 - 3.8	0.99	0.9 - 1.1	50.9	22.8 - 78.6	52.2	44.3 - 60.1	<b>52.1</b>
<b>GUCI<sup>1</sup></b>	0.816 (0.751-0.870)	>30.4200	57.35	48.6 - 65.8	92.86	80.5 - 98.5	8.03	2.7 - 24.1	0.46	0.4 - 0.6	88.1	76.5 - 95.3	70.2	61.3 - 78.2	<b>75.8</b>
<b>GUCI<sup>2</sup></b>	0.816 (0.751-0.870)	>30.4200	57.35	48.6 - 65.8	92.86	80.5 - 98.5	8.03	2.7 - 24.1	0.46	0.4 - 0.6	88.1	76.5 - 95.3	70.2	61.3 - 78.2	<b>75.8</b>
<b>GUCI<sup>3</sup></b>	0.816 (0.751-0.870)	>15.5429	91.18	85.1 - 95.4	57.14	41.0 - 72.3	2.13	1.5 - 3.0	0.15	0.08 - 0.3	66.3	56.9 - 74.7	87.5	76.4 - 94.6	<b>73.5</b>
<b>GUCI<sup>4</sup></b>	0.816 (0.751-0.870)	>30.1909	57.35	48.6 - 65.8	90.48	77.4 - 97.3	6.02	2.3 - 15.5	0.47	0.4 - 0.6	84.8	72.8 - 92.9	69.7	60.6 - 77.7	<b>74.6</b>
<b>LOK<sup>1</sup></b>	0.683 (0.609-0.750)	>-1.5009	82.35	74.9 - 88.4	42.86	27.7 - 59.0	1.44	1.1 - 1.9	0.41	0.2 - 0.7	57.1	47.9 - 66.0	72.5	58.6 - 83.7	<b>61.8</b>
<b>LOK<sup>2</sup></b>	0.683 (0.609-0.750)	>-0.8499	53.68	44.9 - 62.3	73.81	58.0 - 86.1	2.05	1.2 - 3.5	0.63	0.5 - 0.8	65.4	53.1 - 76.4	63.3	53.5 - 72.4	<b>64.1</b>
<b>LOK<sup>3</sup></b>	0.683 (0.609-0.750)	>-1.6169	90.44	84.2 - 94.8	35.71	21.6 - 52.0	1.41	1.1 - 1.8	0.27	0.1 - 0.5	56.5	47.7 - 65.0	80.2	64.8 - 91.0	<b>62.0</b>
<b>LOK<sup>4</sup></b>	0.683 (0.609-0.750)	>-0.4113	32.35	24.6 - 40.9	90.48	77.4 - 97.3	3.40	1.3 - 8.9	0.75	0.6 - 0.9	75.8	58.7 - 88.5	59.2	50.6 - 67.4	<b>62.6</b>
<b>Forns<sup>1</sup></b>	0.860 (0.799-0.908)	>4.5887	78.03	70.0 - 84.8	82.93	67.9 - 92.8	4.57	2.3 - 9.0	0.26	0.2 - 0.4	80.8	70.5 - 88.8	80.4	70.8 - 87.9	<b>80.6</b>
<b>Forns<sup>2</sup></b>	0.860 (0.799-0.908)	>5.0377	68.18	59.5 - 76.0	92.68	80.1 - 98.5	9.32	3.1 - 27.9	0.34	0.3 - 0.4	89.6	79.3 - 95.9	75.9	66.8 - 83.6	<b>80.9</b>
<b>Forns<sup>3</sup></b>	0.860 (0.799-0.908)	>3.6421	90.15	83.7 - 94.7	56.1	39.7 - 71.5	2.05	1.4 - 2.9	0.18	0.10 - 0.3	65.5	56.0 - 74.1	86.1	74.4 - 93.7	<b>72.4</b>
<b>Forns<sup>4</sup></b>	0.860 (0.799-0.908)	>4.9498	69.70	61.1 - 77.4	90.24	76.9 - 97.3	7.14	2.8 - 18.2	0.34	0.3 - 0.4	86.8	76.2 - 93.9	76.3	67.1 - 84.1	<b>80.4</b>



<b>FI<sup>1</sup></b>	0.675 (0.598-0.745)	>1.8300	48.46	39.6 - 57.4	89.74	75.8 - 97.1	4.73	1.8 - 12.2	0.57	0.5 - 0.7	81.3	67.5 - 91.1	65.4	56.1 - 73.8	<b>69.9</b>
<b>FI<sup>2</sup></b>	0.675 (0.598-0.745)	>1.8300	48.46	39.6 - 57.4	89.74	75.8 - 97.1	4.73	1.8 - 12.2	0.57	0.5 - 0.7	81.3	67.5 - 91.1	65.4	56.1 - 73.8	<b>69.9</b>
<b>FI<sup>3</sup></b>	0.675 (0.598-0.745)	>0.9800	90.77	84.4 - 95.1	17.95	7.5 - 33.5	1.11	0.9 - 1.3	0.51	0.2 - 1.2	50.5	42.1 - 58.9	67.8	45.3 - 85.5	<b>52.9</b>
<b>FI<sup>4</sup></b>	0.675 (0.598-0.745)	>2.1300	29.23	21.6 - 37.8	92.31	79.1 - 98.4	3.80	1.2 - 11.6	0.77	0.7 - 0.9	77.8	59.0 - 90.8	58.6	49.9 - 66.9	<b>62.0</b>
<b>FCI<sup>1</sup></b>	0.522 (0.443-0.599)	>0.1943	20.00	13.5 - 27.9	94.74	82.3 - 99.4	3.80	0.9 - 15.3	0.84	0.8 - 0.9	77.8	53.9 - 93.0	56.2	47.8 - 64.4	<b>58.9</b>
<b>FCI<sup>2</sup></b>	0.522 (0.443-0.599)	>0.1943	20.00	13.5 - 27.9	94.74	82.3 - 99.4	3.80	0.9 - 15.3	0.84	0.8 - 0.9	77.8	53.9 - 93.0	56.2	47.8 - 64.4	<b>58.9</b>
<b>FCI<sup>3</sup></b>	0.522 (0.443-0.599)	>0.0386	90.00	83.5 - 94.6	15.79	6.0 - 31.3	1.07	0.9 - 1.2	0.63	0.3 - 1.6	49.7	41.3 - 58.0	63.1	39.6 - 82.8	<b>51.4</b>
<b>FCI<sup>4</sup></b>	0.522 (0.443-0.599)	>0.1941	20.00	13.5 - 27.9	92.11	78.6 - 98.3	2.53	0.8 - 7.9	0.87	0.8 - 1.0	70.0	47.6 - 87.1	55.5	47.0 - 63.8	<b>57.5</b>

---

## Anexo II. Cont.

F>2															
	AUC.ROC	Cutoff	S (%)	IC	E (%)	IC	RPP (%)	IC	RPN (%)	IC	VPP (%)	IC	VPN (%)	IC	PPD (%)
<b>AS<sup>1</sup></b>	0.920 (0.870-0.955)	>2.3967	81.43	70.3 - 89.7	91.67	84.8 - 96.1	9.77	5.2 - 18.4	0.20	0.1 - 0.3	77.4	63.1 - 88.2	93.4	87.6 - 97.0	<b>89.0</b>
<b>AS<sup>2</sup></b>	0.920 (0.870-0.955)	>2.3967	81.43	70.3 - 89.7	91.67	84.8 - 96.1	9.77	5.2 - 18.4	0.20	0.1 - 0.3	77.4	63.1 - 88.2	93.4	87.6 - 97.0	<b>89.0</b>
<b>AS<sup>3</sup></b>	0.920 (0.870-0.955)	>2.1267	90.00	80.5 - 95.9	69.44	59.8 - 77.9	2.95	2.2 - 4.0	0.14	0.07 - 0.3	50.9	39.5 - 62.1	95.2	88.8 - 98.5	<b>74.8</b>
<b>AS<sup>4</sup></b>	0.920 (0.870-0.955)	>2.3850	81.43	70.3 - 89.7	90.74	83.6 - 95.5	8.79	4.8 - 16.0	0.20	0.1 - 0.3	75.5	61.2 - 86.7	93.3	87.5 - 97.0	<b>88.3</b>
<b>APRI<sup>1</sup></b>	0.882 (0.825-0.925)	>0.8069	80.00	68.7 - 88.6	86.11	78.1 - 92.0	5.76	3.5 - 9.3	0.23	0.1 - 0.4	66.9	52.9 - 79.0	92.5	86.2 - 96.5	<b>84.5</b>
<b>APRI<sup>2</sup></b>	0.882 (0.825-0.925)	>1.0243	65.71	53.4 - 76.7	92.59	85.9 - 96.7	8.87	4.5 - 17.7	0.37	0.3 - 0.5	75.7	59.6 - 87.8	88.5	81.9 - 93.3	<b>85.6</b>
<b>APRI<sup>3</sup></b>	0.882 (0.825-0.925)	>0.5769	90.00	80.5 - 95.9	62.04	52.2 - 71.2	2.37	1.8 - 3.1	0.16	0.08 - 0.3	45.4	35.0 - 56.2	94.6	87.6 - 98.3	<b>69.3</b>
<b>APRI<sup>4</sup></b>	0.882 (0.825-0.925)	>0.9829	67.14	54.9 - 77.9	90.74	83.6 - 95.5	7.25	3.9 - 13.4	0.36	0.3 - 0.5	71.8	56.0 - 84.5	88.7	82.1 - 93.5	<b>84.6</b>
<b>FIB4<sup>1</sup></b>	0.880 (0.823-0.924)	>1.7538	72.86	60.9 - 82.8	87.04	79.2 - 92.7	5.62	3.4 - 9.4	0.31	0.2 - 0.5	66.4	51.6 - 79.1	90.1	83.6 - 94.7	<b>83.4</b>
<b>FIB4<sup>2</sup></b>	0.880 (0.823-0.924)	>2.0651	57.14	44.7 - 68.9	94.44	88.3 - 97.9	10.29	4.6 - 23.0	0.45	0.3 - 0.6	78.3	60.6 - 90.7	86.2	79.5 - 91.4	<b>84.7</b>
<b>FIB4<sup>3</sup></b>	0.880 (0.823-0.924)	>1.2399	90.00	80.5 - 95.9	64.81	55.0 - 73.8	2.56	2.0 - 3.3	0.15	0.08 - 0.3	47.3	36.5 - 58.3	94.9	88.1 - 98.4	<b>71.4</b>
<b>FIB4<sup>4</sup></b>	0.880 (0.823-0.924)	>1.8710	65.71	53.4 - 76.7	90.74	83.6 - 95.5	7.10	3.8 - 13.1	0.38	0.3 - 0.5	71.4	55.4 - 84.2	88.3	81.6 - 93.2	<b>84.2</b>
<b>KING<sup>1</sup></b>	0.896 (0.842-0.937)	>12.8571	87.14	77.0 - 93.9	75.93	66.7 - 83.6	3.62	2.6 - 5.1	0.17	0.09 - 0.3	56.0	43.8 - 67.7	94.4	88.1 - 97.9	<b>78.8</b>
<b>KING<sup>2</sup></b>	0.896 (0.842-0.937)	>18.0519	72.86	60.9 - 82.8	89.81	82.5 - 94.8	7.15	4.0 - 12.8	0.30	0.2 - 0.4	71.5	56.5 - 83.7	90.4	84.0 - 94.9	<b>85.4</b>

<b>KING<sup>3</sup></b>	0.896 (0.842-0.937)	>12.0313	90.00	80.5 - 95.9	71.30	61.8 - 79.6	3.14	2.3 - 4.3	0.14	0.07 - 0.3	52.4	40.9 - 63.8	95.3	89.0 - 98.5	<b>76.2</b>
<b>KING<sup>4</sup></b>	0.896 (0.842-0.937)	>20.4209	62.86	50.5 - 74.1	90.74	83.6 - 95.5	6.79	3.7 - 12.6	0.41	0.3 - 0.6	70.5	54.2 - 83.7	87.4	80.7 - 92.5	<b>83.5</b>
<b>AAR<sup>1</sup></b>	0.617 (0.542-0.689)	>0.7363	45.07	33.2 - 57.3	77.78	68.8 - 85.2	2.03	1.3 - 3.1	0.71	0.6 - 0.9	41.6	27.8 - 56.4	80.1	72.1 - 86.6	<b>69.3</b>
<b>AAR<sup>2</sup></b>	0.617 (0.542-0.689)	>1.3846	1.41	0.04 - 7.6	100.00	96.6 - 100	-	-	0.99	1.0 - 1.0	100.0	50.0 - 100.	74.3	67.2 - 80.5	<b>74.4</b>
<b>AAR<sup>3</sup></b>	0.617 (0.542-0.689)	>0.4538	90.14	80.7 - 95.9	10.19	5.2 - 17.5	1.00	0.9 - 1.1	0.97	0.4 - 2.4	26.1	19.5 - 33.6	74.6	49.0 - 91.8	<b>31.0</b>
<b>AAR<sup>4</sup></b>	0.617 (0.542-0.689)	>0.9118	15.49	8.0 - 26.0	90.74	83.6 - 95.5	1.67	0.8 - 3.7	0.93	0.8 - 1.0	37.0	16.4 - 61.8	75.3	67.9 - 81.8	<b>71.2</b>
<b>GUCI<sup>1</sup></b>	0.881 (0.825-0.925)	>32.137	82.86	72.0 - 90.8	82.41	73.9 - 89.1	4.71	3.1 - 7.2	0.21	0.1 - 0.4	62.3	49.0 - 74.4	93.2	87.0 - 97.0	<b>82.5</b>
<b>GUCI<sup>2</sup></b>	0.881 (0.825-0.925)	>48.9583	58.57	46.2 - 70.2	95.37	89.5 - 98.5	12.65	5.3 - 30.5	0.43	0.3 - 0.6	81.6	64.3 - 92.9	86.8	80.1 - 91.8	<b>85.8</b>
<b>GUCI<sup>3</sup></b>	0.881 (0.825-0.925)	>26.0556	90.00	80.5 - 95.9	67.59	57.9 - 76.3	2.78	2.1 - 3.7	0.15	0.07 - 0.3	49.4	38.3 - 60.5	95.1	88.5 - 98.5	<b>73.4</b>
<b>GUCI<sup>4</sup></b>	0.881 (0.825-0.925)	>38.5299	71.43	59.4 - 81.6	90.74	83.6 - 95.5	7.71	4.2 - 14.2	0.31	0.2 - 0.5	73.0	57.7 - 85.2	90.0	83.6 - 94.6	<b>85.7</b>
<b>LOK<sup>1</sup></b>	0.771 (0.702-0.831)	>-0.7447	70.00	57.9 - 80.4	75.00	65.7 - 82.8	2.80	2.0 - 4.0	0.40	0.3 - 0.6	49.6	36.9 - 62.3	87.7	80.1 - 93.1	<b>73.7</b>
<b>LOK<sup>2</sup></b>	0.771 (0.702-0.831)	>-0.1938	34.29	23.3 - 46.6	93.52	87.1 - 97.4	5.29	2.4 - 11.6	0.70	0.6 - 0.8	65.0	43.0 - 83.1	80.2	73.0 - 86.2	<b>78.1</b>
<b>LOK<sup>3</sup></b>	0.771 (0.702-0.831)	>-1.3542	90.00	80.5 - 95.9	37.04	27.9 - 46.9	1.43	1.2 - 1.7	0.27	0.1 - 0.6	33.4	25.2 - 42.5	91.3	80.3 - 97.3	<b>50.8</b>
<b>LOK<sup>4</sup></b>	0.771 (0.702-0.831)	>-0.2708	37.14	25.9 - 49.5	90.74	83.6 - 95.5	4.01	2.1 - 7.8	0.69	0.6 - 0.8	58.5	38.8 - 76.4	80.4	73.1 - 86.5	<b>76.8</b>
<b>Forns<sup>1</sup></b>	0.857 (0.796-0.905)	>5.0262	91.18	81.8 - 96.7	68.57	58.8 - 77.3	2.90	2.2 - 3.9	0.13	0.06 - 0.3	50.5	39.1 - 61.8	95.7	89.2 - 98.8	<b>74.4</b>
<b>Forns<sup>2</sup></b>	0.857 (0.796-0.905)	>6.4581	52.94	40.4 - 65.2	93.33	86.7 - 97.3	7.94	3.8 - 16.8	0.50	0.4 - 0.7	73.6	55.1 - 87.5	85.0	77.9 - 90.4	<b>82.8</b>
<b>Forns<sup>3</sup></b>	0.857 (0.796-0.905)	>5.0262	91.18	81.8 - 96.7	68.57	58.8 - 77.3	2.90	2.2 - 3.9	0.13	0.06 - 0.3	50.5	39.1 - 61.8	95.7	89.2 - 98.8	<b>74.4</b>
<b>Forns<sup>4</sup></b>	0.857 (0.796-0.905)	>6.2584	57.35	44.8 - 69.3	90.48	83.2 - 95.3	6.02	3.2 - 11.2	0.47	0.4 - 0.6	67.9	50.6 - 82.3	85.8	78.7 - 91.2	<b>81.9</b>

<b>FI<sup>1</sup></b>	0.764 (0.693-0.826)	>1.8300	70.77	58.2 - 81.4	79.81	70.8 - 87.0	3.50	2.3 - 5.3	0.37	0.2 - 0.5	55.2	41.3 - 68.5	88.6	81.2 - 93.8	<b>77.5</b>
<b>FI<sup>2</sup></b>	0.764 (0.693-0.826)	>2.2400	41.54	29.4 - 54.4	93.27	86.6 - 97.3	6.17	2.9 - 13.3	0.63	0.5 - 0.8	68.4	47.4 - 85.1	82.0	74.6 - 87.9	<b>79.8</b>
<b>FI<sup>3</sup></b>	0.764 (0.693-0.826)	>1.2500	89.23	79.1 - 95.6	34.62	25.6 - 44.6	1.36	1.2 - 1.6	0.31	0.1 - 0.7	32.4	24.2 - 41.6	90.1	78.1 - 96.9	<b>48.8</b>
<b>FI<sup>4</sup></b>	0.764 (0.693-0.826)	>2.1600	44.62	32.3 - 57.5	90.38	83.0 - 95.3	4.64	2.4 - 8.9	0.61	0.5 - 0.8	62.0	42.9 - 78.7	82.3	74.8 - 88.3	<b>78.5</b>
<b>FCI<sup>1</sup></b>	0.696 (0.621-0.765)	>0.1513	47.69	35.1 - 60.5	84.47	76.0 - 90.9	3.07	1.8 - 5.2	0.62	0.5 - 0.8	51.9	35.6 - 67.9	82.1	74.3 - 88.4	<b>74.9</b>
<b>FCI<sup>2</sup></b>	0.696 (0.621-0.765)	>0.2353	26.15	16.0 - 38.5	98.06	93.2 - 99.8	13.47	3.2 - 56.4	0.75	0.6 - 0.9	82.6	52.2 - 97.4	79.1	71.8 - 85.2	<b>79.4</b>
<b>FCI<sup>3</sup></b>	0.696 (0.621-0.765)	>0.0459	90.77	81.0 - 96.5	25.24	17.2 - 34.8	1.21	1.1 - 1.4	0.37	0.2 - 0.8	29.9	22.2 - 38.5	88.6	73.3 - 96.8	<b>42.3</b>
<b>FCI<sup>4</sup></b>	0.696 (0.621-0.765)	>0.1804	33.85	22.6 - 46.6	90.29	82.9 - 95.2	3.49	1.8 - 6.9	0.73	0.6 - 0.9	55.1	34.5 - 74.4	79.5	71.9 - 85.9	<b>75.6</b>

Anexo II. Cont.

F>3															
	AUC-ROC	Cutoff	S (%)	IC	E (%)	IC	RPP (%)	IC	RPN (%)	IC	VPP (%)	IC	VPN (%)	IC	PPD (%)
AS <sup>1</sup>	0.923 (0.873-0.957)	>2.5393	96.77	83.3 - 99.9	78.91	71.4 - 85.2	4.59	3.3 - 6.3	0.04	0.006 - 0.3	38.5	25.5 - 52.9	99.4	96.0 - 100.	81.1
AS <sup>2</sup>	0.923 (0.873-0.957)	>3.0687	67.74	48.6 - 83.3	93.88	88.7 - 97.2	11.06	5.6 - 21.8	0.34	0.2 - 0.6	60.1	38.3 - 79.3	95.5	90.9 - 98.2	90.7
AS <sup>3</sup>	0.923 (0.873-0.957)	>2.6063	90.32	74.2 - 98.0	82.31	75.2 - 88.1	5.11	4.5 - 5.9	0.12	0.04 - 0.4	41.1	26.8 - 56.5	98.4	94.5 - 99.8	83.3
AS <sup>4</sup>	0.923 (0.873-0.957)	>2.9035	74.19	55.4 - 88.1	90.48	84.5 - 94.7	7.79	4.5 - 13.4	0.29	0.2 - 0.5	51.5	32.7 - 70.1	96.3	91.8 - 98.7	88.5
APRI <sup>1</sup>	0.887 (0.831-0.930)	>0.7401	100.00	88.8 - 100.	67.35	59.1 - 74.8	3.06	2.4 - 3.9	0.00	-	29.5	19.3 - 41.4	100	96.5 - 100.	71.3
APRI <sup>2</sup>	0.887 (0.831-0.930)	>2.0504	35.48	19.2 - 54.6	97.96	94.2 - 99.6	17.39	5.2 - 58.7	0.66	0.5 - 0.9	70.3	35.1 - 93.5	91.8	86.5 - 95.4	90.5
APRI <sup>3</sup>	0.887 (0.831-0.930)	>0.8386	90.32	74.2 - 98.0	73.47	65.6 - 80.4	3.40	2.5 - 4.6	0.13	0.04 - 0.4	31.7	20.3 - 45.0	98.2	93.9 - 99.8	75.5
APRI <sup>4</sup>	0.887 (0.831-0.930)	>1.4469	51.61	33.1 - 69.8	90.48	84.5 - 94.7	5.42	3.0 - 9.9	0.53	0.4 - 0.8	42.5	23.2 - 63.7	93.2	88.0 - 96.6	85.8
FIB4 <sup>1</sup>	0.858 (0.978-0.906)	>1.5558	93.55	78.6 - 99.2	70.07	62.0 - 77.3	3.13	2.4 - 4.1	0.092	0.02 - 0.4	29.9	19.2 - 42.4	98.8	94.5 - 99.9	72.9
FIB4 <sup>2</sup>	0.858 (0.978-0.906)	>3.4289	29.03	14.2 - 48.0	97.28	93.2 - 99.3	10.67	3.5 - 32.4	0.73	0.6 - 0.9	59.3	25.7 - 87.4	91.0	85.5 - 94.8	89.1
FIB4 <sup>3</sup>	0.858 (0.978-0.906)	>1.5887	90.32	74.2 - 98.0	70.75	62.7 - 78.0	3.09	2.3 - 4.1	0.14	0.05 - 0.4	29.6	18.9 - 42.2	98.2	93.6 - 99.8	73.1
FIB4 <sup>4</sup>	0.858 (0.978-0.906)	>2.4433	58.06	39.1 - 75.5	90.48	84.5 - 94.7	6.10	3.4 - 10.9	0.46	0.3 - 0.7	45.4	26.3 - 65.6	94.1	89.0 - 97.3	86.6
KING <sup>1</sup>	0.878 (0.821-0.923)	>16.6327	90.32	74.2 - 98.0	73.47	65.6 - 80.4	3.40	2.5 - 4.6	0.13	0.04 - 0.4	31.7	20.3 - 45.0	98.2	93.9 - 99.8	75.5
KING <sup>2</sup>	0.878 (0.821-0.923)	>50.6849	29.03	14.2 - 48.0	98.64	95.2 - 99.8	21.34	4.8 - 94.0	0.72	0.6 - 0.9	74.4	34.4 - 96.6	91.1	85.7 - 94.9	90.3

<b>KING<sup>3</sup></b>	0.878 (0.821-0.923)	>16.6327	90.32	74.2 - 98.0	73.47	65.6 - 80.4	3.40	2.5 - 4.6	0.13	0.04 - 0.4	31.7	20.3 - 45.0	98.2	93.9 - 99.8	<b>75.5</b>
<b>KING<sup>4</sup></b>	0.878 (0.821-0.923)	>29.2827	51.61	33.1 - 69.8	90.48	84.5 - 94.7	5.42	3.0 - 9.9	0.53	0.4 - 0.8	42.5	23.2 - 63.7	93.2	88.0 - 96.6	<b>85.8</b>
<b>AAR<sup>1</sup></b>	0.643 (0.568-0.713)	>0.5444	96.77	83.3 - 99.9	31.08	23.7 - 39.2	1.40	1.2 - 1.6	0.1	0.01 - 0.7	16.1	10.2 - 23.6	98.6	90.2 - 100.	<b>39.0</b>
<b>AAR<sup>2</sup></b>	0.643 (0.568-0.713)	>1.3846	3.23	0.08 - 16.7	100.00	97.5 - 100.	-	-	0.97	0.9 - 1.0	100.0	50.0 - 100.	88.3	82.7 - 92.7	<b>88.4</b>
<b>AAR<sup>3</sup></b>	0.643 (0.568-0.713)	>0.5490	90.32	74.2 - 98.0	31.08	23.7 - 39.2	1.31	1.1 - 1.5	0.31	0.1 - 0.9	15.2	9.4 - 22.6	95.9	86.3 - 99.5	<b>38.2</b>
<b>AAR<sup>4</sup></b>	0.643 (0.568-0.713)	>0.9600	16.13	5.5 - 33.7	90.54	84.6 - 94.7	1.71	0.7 - 4.4	0.93	0.8 - 1.1	18.9	4.6 - 43.9	88.8	82.8 - 93.2	<b>81.6</b>
<b>GUCI<sup>1</sup></b>	0.896 (0.841-0.936)	>32.9412	100.00	88.8 - 100.	70.07	62.0 - 77.3	3.34	2.6 - 4.3	0	-	31.3	20.6 - 43.7	100.0	96.7 - 100.	<b>73.7</b>
<b>GUCI<sup>2</sup></b>	0.896 (0.841-0.936)	>100.7660	35.48	19.2 - 54.6	98.64	95.2 - 99.8	26.08	6.1 - 111.9	0.65	0.5 - 0.8	78.1	40.3 - 97.3	91.8	86.6 - 95.5	<b>91.1</b>
<b>GUCI<sup>3</sup></b>	0.896 (0.841-0.936)	>35.6000	90.32	74.2 - 98.0	73.47	65.6 - 80.4	3.40	2.5 - 4.6	0.13	0.04 - 0.4	31.7	20.3 - 45.0	98.2	93.9 - 99.8	<b>75.5</b>
<b>GUCI<sup>4</sup></b>	0.896 (0.841-0.936)	>63.1628	54.84	36.0 - 72.7	90.48	84.5 - 94.7	5.76	3.2 - 10.4	0.50	0.3 - 0.7	44.0	24.7 - 64.6	93.6	88.5 - 97.0	<b>86.2</b>
<b>LOK<sup>1</sup></b>	0.882 (0.825-0.926)	>-0.3791	83.87	66.3 - 94.5	85.71	79.0 - 90.9	5.87	3.8 - 9.0	0.19	0.08 - 0.4	44.5	28.8 - 61.0	97.5	93.3 - 99.4	<b>85.5</b>
<b>LOK<sup>2</sup></b>	0.882 (0.825-0.926)	>0.7077	16.13	5.5 - 33.7	99.32	96.3 - 100.	23.71	2.9 - 195.9	0.84	0.7 - 1.0	76.4	20.3 - 99.5	89.7	84.1 - 93.8	<b>89.3</b>
<b>LOK<sup>3</sup></b>	0.882 (0.825-0.926)	>-0.6845	90.32	74.2 - 98.0	73.47	65.6 - 80.4	3.40	2.5 - 4.6	0.13	0.04 - 0.4	31.7	20.3 - 45.0	98.2	93.9 - 99.8	<b>75.5</b>
<b>LOK<sup>4</sup></b>	0.882 (0.825-0.926)	>-0.2643	67.74	48.6 - 83.3	90.48	84.5 - 94.7	7.11	4.1 - 12.4	0.36	0.2 - 0.6	49.2	30.3 - 68.3	95.4	90.6 - 98.1	<b>87.7</b>
<b>Forns<sup>1</sup></b>	0.849 (0.787-0.899)	>6.5692	70.00	50.6 - 85.3	85.31	78.4 - 90.7	4.77	3.0 - 7.5	0.35	0.2 - 0.6	39.4	23.6 - 57.0	95.4	90.4 - 98.3	<b>83.5</b>
<b>Forns<sup>2</sup></b>	0.849 (0.787-0.899)	>7.0365	43.33	25.5 - 62.6	95.80	91.1 - 98.4	10.33	4.3 - 25.0	0.59	0.4 - 0.8	58.5	31.0 - 82.6	92.5	87.2 - 96.1	<b>89.5</b>
<b>Forns<sup>3</sup></b>	0.849 (0.787-0.899)	>5.0706	90.00	73.5 - 97.9	55.94	47.4 - 64.2	2.04	1.6 - 2.5	0.18	0.06 - 0.5	21.8	13.6 - 32.1	97.6	91.8 - 99.7	<b>60.0</b>
<b>Forns<sup>4</sup></b>	0.849 (0.787-0.899)	>6.8498	53.33	34.3 - 71.7	90.21	84.1 - 94.5	5.45	3.0 - 9.9	0.52	0.4 - 0.8	42.6	23.3 - 63.8	93.4	88.1 - 96.8	<b>85.8</b>

<b>FI<sup>1</sup></b>	0.805 (0.737-0.861)	>2.0300	75.86	56.5 - 89.7	79.29	71.6 - 85.7	3.66	2.5 - 5.4	0.30	0.2 - 0.6	33.3	20.1 - 48.7	96.0	90.8 - 98.7	<b>78.9</b>
<b>FI<sup>2</sup></b>	0.805 (0.737-0.861)	>3.1200	10.34	2.2 - 27.4	99.29	96.1 - 100.	14.48	1.6 - 134.4	0.90	0.8 - 1.0	66.4	9.3 - 99.1	89.0	83.2 - 93.4	<b>88.6</b>
<b>FI<sup>3</sup></b>	0.805 (0.737-0.861)	>1.4200	93.10	77.2 - 99.2	41.43	33.2 - 50.1	1.59	1.3 - 1.9	0.17	0.04 - 0.6	17.8	11.0 - 26.5	97.8	90.5 - 99.9	<b>47.6</b>
<b>FI<sup>4</sup></b>	0.805 (0.737-0.861)	>2.3600	48.28	29.4 - 67.5	90.00	83.8 - 94.4	4.83	2.6 - 9.0	0.57	0.4 - 0.8	39.7	20.5 - 61.5	92.7	87.2 - 96.4	<b>85.0</b>
<b>FCI<sup>1</sup></b>	0.750 (0.677-0.813)	>0.2069	48.28	29.4 - 67.5	92.81	87.2 - 96.5	6.71	3.3 - 13.6	0.56	0.4 - 0.8	47.8	25.3 - 70.9	92.9	87.5 - 96.5	<b>87.5</b>
<b>FCI<sup>2</sup></b>	0.750 (0.677-0.813)	>0.3324	31.03	15.3 - 50.8	100.00	97.4 - 100.	-	-	0.69	0.5 - 0.9	100.0	54.1 - 100.	91.4	86.0 - 95.2	<b>91.7</b>
<b>FCI<sup>3</sup></b>	0.750 (0.677-0.813)	>0.0550	93.10	77.2 - 99.2	27.34	20.1 - 35.5	1.28	1.1 - 1.5	0.25	0.06 - 1.0	14.9	9.2 - 22.3	96.7	85.8 - 99.8	<b>35.2</b>
<b>FCI<sup>4</sup></b>	0.750 (0.677-0.813)	>0.1974	48.28	29.4 - 67.5	90.65	84.5 - 94.9	5.16	2.7 - 9.8	0.57	0.4 - 0.8	41.3	21.4 - 63.5	92.8	87.3 - 96.4	<b>85.6</b>

<sup>1</sup>Índice Youden; <sup>2</sup>Criterio óptimo; <sup>3</sup>90% Sensibilidad; <sup>4</sup>90% Especificidad; S = Sensibilidad; E = Especificidad; RPP = Razón de Probabilidad Positiva; RPN = Razón de Probabilidad Negativa; VPP = Valor Predictivo Positivo; VPN = Valor Predictivo Negativo; PPP = Precisión de la Prueba Diagnóstica. AS =AngioScore (Ang2, plaquetas, AST, GGT, INR, edad); APRI (AST, Plaquetas); FIB4 (edad, AST, plaquetas, ALT); KING (edad, AST, INR, plaquetas); AAR (AST, ALT); GUCI (AST, INR, plaquetas); LOK (plaquetas, AST, ALT, INR); Forns (plaquetas, GGT, edad, colesterol); FI (plaquetas, albúmina); FCI (fosfatasa alcalina, bilirrubina total, albúmina, plaquetas; n = 178 pacientes con HCC excepto: Forns, n = 173;FI, n=169; FCI, n = 168.